

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“ BÚSQUEDA DE POSIBLES MECANISMOS  
DE REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE  
EQUILIBRIO DE RNAm EN EPIMASTIGOTES  
DE Trypanosoma cruzi ”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

**MARIANA PÉREZ ESCOBAR**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ**

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de Enero de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **MARIANA PÉREZ ESCOBAR** con número de cuenta **95576745** con la tesis titulada: "**Búsqueda de posibles mecanismos de regulación de los niveles de equilibrio de RNAm en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***", realizada bajo la dirección del **DR. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ**:

Presidente:	DR. ROBERTO CORIA ORTEGA
Vocal:	DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO
Vocal:	DR. LUIS PADILLA NORIEGA
Vocal:	DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA
Secretario:	DR. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
Suplente:	DRA. HERMINIA DE JESÚS LOZA TAVERA
Suplente:	DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F. a 2 de Abril de 2008.

  
Dr. Juan Nuñez Farfán  
Coordinador del Programa

# AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México la enorme oportunidad que me proporcionó para obtener mi formación, primero como Bióloga y después como Doctora en Ciencias.

Por extensión agradezco también al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme cursar estudios de posgrado con su aprobación y apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (DGEP), por haberme beneficiado con las becas sin las cuales me habría sido imposible realizar dichos estudios.

A mi comité tutorial conformado por los Doctores Bertha Espinoza Gutiérrez, Abraham Landa Piedra y Ana María Cevallos, quienes en cada evaluación semestral no dudaban en hacer sugerencias y darme consejos para el mejoramiento de mi desempeño así como el feliz término del proyecto.

A los miembros del jurado examinador que muy amablemente realizaron la revisión de mi tesis y que contribuyeron con sus observaciones a hacerla mejor, Dr. Roberto Coria Ortega, Dr. Luis Padilla Noriega, Dra. Imelda López Villaseñor, Dra. Laura Camarena Mejía, Dr. Santiago Martínez Calvillo y Dra. Herminia Loza Tavera.

De igual forma agradezco mucho la ayuda técnica de la QFB Juliana Herrera López.

Finalmente y de forma muy especial agradezco al Dr. Roberto Hernández Fernández, por su dedicada y muy amable guía, las valiosas enseñanzas adquiridas en su laboratorio se que me serán útiles a lo largo de mi desempeño profesional.

# CONTENIDO

## ABREVIATURAS USADAS

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE CUADROS Y TABLAS

## RESUMEN

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades de la biología de *Trypanosoma cruzi*.

1.1.1 Los cinetopláستidos y *Trypanosoma cruzi*.

1.1.1.1 Clasificación de *Trypanosoma cruzi*, un taxón, varios grupos.

1.1.2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

1.1.3 Enfermedad de Chagas

1.1.3.1 Transmisión

1.1.3.2 Desarrollo de la enfermedad

1.1.3.3 Diagnóstico

1.1.3.4 Situación de la enfermedad de Chagas en México

### 1.2 Aspectos particulares de la biología de *Trypanosoma cruzi*

1.2.1 Edición post-transcripcional de RNA mensajeros mitocondriales.

1.2.2 Arquitectura genómica.

1.2.3 Transcripción y su regulación.

1.2.4 *Trans* splicing

### 1.3 Regulación post transcripcional: Metabolismo de RNAm.

1.3.1 En Eucariontes superiores

1.3.1.1 Splicing

1.3.1.2 Poliadenilación

1.3.1.3 Estabilidad del RNAm

1.3.1.4 Degradación

1.3.2 En Tripanosomátidos.

1.3.2.1 *Trans* splicing

- 1.3.2.2 Poliadenilación
- 1.3.2.3 Estabilidad del RNAm
- 1.3.2.4 Maquinaria de degradación.

#### **1.4. Justificación y antecedentes directos.**

- 1.4.1 Por qué estudiar genes ribosomales?
- 1.4.2 La proteína ribosomal S4

## **2 OBJETIVOS**

- 2.1 Objetivo general
- 2.2 Objetivos particulares

## **3 RESULTADOS**

### **3.1 Arreglo genómico de S4 en *Trypanosoma cruzi*.**

- 3.1.1 Clonación y análisis de la secuencia del locus de la proteína ribosomal S4 en *Trypanosoma cruzi*.
- 3.1.2 Caracterización de los sitios de procesamiento de los RNAm de la proteína ribosomal S4.

### **3.2 Determinación de la expresión del RNAm de S4 en epimastigotes de *T. cruzi*.**

- 3.2.1 Establecimiento del sistema experimental.
- 3.2.2 Determinación de los niveles de RNAm de S4 en un cultivo de epimastigotes.
- 3.2.3 Determinación de la vida media de los RNAm en las fases logarítmica y estacionaria del cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*.

### **3.3 Búsqueda del mecanismo estabilizador de RNAm.**

- 3.3.1 Búsqueda de elementos conservados en las secuencias de los RNAm de genes de mantenimiento.
- 3.3.2 Participación de la cola de poli A.
- 3.3.3 Degradación diferencial de transcritos endógenos.
- 3.3.4 Estabilidad de RNAm de genes de expresión estadio específica

3.3.5 Diversidad de RNAsas presentes en el genoma de *T. cruzi*

## **4 DISCUSIÓN**

## **5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

## **6 MATERIALES Y MÉTODOS**

6.1 Cultivo de epimastigotes

6.2 Definición de las fases logarítmica y estacionaria

6.3 Consideraciones sobre el manejo de RNA

6.4 Extracción de RNA.

6.5 Determinación de los niveles de equilibrio de RNAm

6.6 Northern blot

6.7 Preparación de sonda con marca radioactiva

6.8 Condiciones de hibridación y lavado

6.9 Determinación de la vida media de RNAm

6.10 Determinación de la longitud de las colas de poli A

6.11 Secuencia de oligonucleótidos secundarios

6.12 Ensayos de degradación de transcritos endógenos

6.13 Búsqueda de genes de expresión estadio específica

6.14 Obtención de DNA que codifica para genes de expresión estadio específica

6.15 Oligonucleótidos para amplificar genes de expresión estadio específica

6.16 Clonación de genes de expresión estadio específica.

## **7 LITERATURA CONSULTADA.**

## **8 ANEXOS**

### **Anexo I**

“The stabilization of housekeeping transcripts in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes evidences a global regulation of RNA decay during stationary phase”. FEMS microbiology letters (2005) 246:259-264. Ana Maria Cevallos,

Mariana Pérez-Escobar, Norma Espinosa, Juliana Herrera, Imelda López-Villaseñor, Roberto Hernández.

## **Anexo II**

“*Trypanosoma cruzi* ribosomal protein S4: characterization of its coding locus, analysis of transcripts, and antigenicity of the protein”. Mem Inst Oswaldo Cruz (2007) Vol 102 (4) 473-479. Mariana Pérez-Escobar, Ana María Cevallos, Bertha Espinoza, Norma Espinosa, Ignacio Martínez, Roberto Hernández.



## ABREVIATURAS USA

3'-5'	En dirección del extremo 3' al 5'
5'-3'	En dirección del extremo 5' al 3'
°C	Grados Celsius
µg	Micro gramos
µl	Micro litro(s)
µM	Micro molar
ARES	Elementos ricos en adenina-guanina
cDNA	DNA complementario
DEPC	Dietil-piro-carbonato
DTT	Dithio treitol
DTU	Unidad Discreta de Tipificación
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
fig	figura
h	Horas
Kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltones
LIT	Medio de cultivo de infusión de hígado y triptona
M	Molar
Mb	Mega bases
min	Minutos
ML	Logarítmica(o) media
ml	Mililitro
mM	Mili molar
ng	Nanogramos
nt	Nucleótido(s)
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
prS4	Proteína ribosomal S4

RNA.....	Acido ribonucléico
RNAg.....	RNA guía
RNAm.....	RNA mensajero
RNAr.....	RNA ribosomal
RNAt.....	RNA de transferencia
rpm.....	Revoluciones por minuto
S.....	Estacionaria (o)
SL.....	Spliced leader o mini exón
TIM.....	Triosa fosfato isomerasa
TR.....	Tripanotión Reductasa
U.....	Uridina
UTR.....	Región no traducida
V.....	Volts

**Figura 1** Posición del género *Trypanosoma* en un árbol filogenético basado en la secuencia del RNAr de la subunidad menor

**Figura 2** División del taxón *Trypanosoma cruzi* en dos principales linajes I y II

**Figura 3** Formas biológicas del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

**Figura 4** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

**Figura 5** Mapa de la distribución de la enfermedad de Chagas

**Figura 6** Aspectos de la enfermedad de Chagas

**Figura 7** Cariotipo de *T. cruzi*

**Figura 8** Arquitectura genómica de tripanosomátidos

**Figura 9** Trans splicing

**Figura 10** Rutas de decaimiento de RNA en eucariontes superiores

**Figura 11** Localización de la proteína ribosomal S4 en el ribosoma y su participación en el proceso de traducción

**Figura 12** Mapa genómico del locus de la proteína ribosomal S4 en *T. cruzi*

**Figura 13** Sitios de procesamiento de los RNAm de S4 en *Trypanosoma cruzi*

**Figura 14** Curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*

**Figura 15** Niveles de RNAm de genes de mantenimiento a una curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*

**Figura 16** Vida media de RNAm de epimastigotes en las fases logarítmica y estacionaria

**Figura 17** Valores de las vidas media de RNAm y precursores de RNAr en fase logarítmica y estacionaria.

**Figura 18** Tamaño de cola de poli A de los RNAm de actina y S4 en las fases logarítmica y estacionaria

**Figura 19** Ensayos de degradación de RNA en lisados celulares de epimastigotes de *T. cruzi*.

**Figura 20** Cinética de acumulación de productos de degradación de RNA

**Figura 21** Perfiles de degradación de RNAr en las fases logarítmica y estacionaria

**Figura 22** Cinética degradativa de precursores de RNAr

**Figura 23** Determinación de la estabilidad del RNAm de dos genes de expresión única en epimastigotes

## LISTA DE CUADROS

**Cuadro 1:** Determinantes de estabilidad de RNAm en eucariontes superiores

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1** Genes descritos para *Trypanosoma cruzi*

**Tabla 2** Vida media en fase logarítmica y estacionaria de RNAm de genes de expresión exclusiva en epimastigotes

**Tabla 3** Genes de la maquinaria de degradación de RNA encontrados en la anotación del genoma de *T. cruzi*

## RESUMEN

En *Trypanosoma cruzi* la regulación de la expresión génica ocurre fundamentalmente a través de mecanismos post transcripcionales. En nuestro laboratorio hemos encontrado que en el estadio epimastigote un grupo compuesto de cuatro genes de mantenimiento se comportan igual en su expresión a nivel de RNAm; dichos transcritos suben sus niveles de expresión en fase logarítmica y poco antes del establecimiento de la fase estacionaria los niveles caen drásticamente. La caída en los niveles de RNAm se encuentra acompañada por la prolongación de la vida media de los cuatro RNAm, hasta cuatro veces su valor comparado con el mismo en fase logarítmica. Este alargamiento en la vida media del RNAm al parecer es independiente de señales presentes en la estructura misma del RNAm ya que no se encontraron posibles elementos reguladores en la secuencia de los mismos. Sin embargo, nuestros datos señalan que en la fase estacionaria existe una disminución de la actividad ribonucleolítica general con respecto a la fase logarítmica. La disminución observada se encuentra en relación con la estabilización de los RNAm. El fenómeno de estabilización de RNAm en fase estacionaria puede ser un fenómeno global de respuesta a condiciones de estrés, ya que no es exclusivo de genes de mantenimiento pues lo encontramos también en dos genes de expresión estadio-específica.

## **ABSTRACT**

In *Trypanosoma cruzi* gene expression is regulated mainly by post transcriptional mechanisms. In our laboratory we found that in epimastigot stage a group of four house keeping genes have the same behavior in their mRNA expression level; those transcripts have high expression levels in logarithmic phase and they drop drastically before the establishment of stationary phase. This reduction of the mRNA levels is related to an extended half life of the four mRNAs, four times its value than in logarithmic phase. These extended half life of the mRNA seems non dependent on signals of the mRNA structure, this because there were no possible regulatory elements identified in the mRNA sequence. However, our data suggest that in stationary phase there is a reduction in the general ribonucleolytic activity compared to logarithmic phase. This ribonucleolytic activity reduction is related with mRNA stability. The mRNA stabilization phenomena in stationary phase may be a global reaction in response to stress conditions, this because we found this behavior not only in house keeping genes but also in two stage specific expression genes.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades de la biología de *Trypanosoma cruzi*

### 1.1.1 Los cinetoplástidos y *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* es el parásito eucarionte unicelular que ocasiona la enfermedad de Chagas (Chagas, 1909). Este organismo pertenece a la clase Kinetoplastea, orden Trypanosomatida (Maslov *et al.*, 1994). El carácter morfológico que define a este grupo biológico es el cinetoplasto, que corresponde a la condensación de DNA mitocondrial (Borst *et al.*, 1982). Esta estructura tiene forma redondeada o de bastón y en ella se encuentra hasta el 30% del DNA total (Borst *et al.*, 1982). Dentro de este grupo biológico se encuentran varios organismos que son objeto de estudio debido a que son agentes causantes de graves enfermedades en el humano y en el ganado: En África el complejo de especies *Trypanosoma brucei* causan la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana, las especies del género *Leishmania* ocasionan Leishmaniasis tanto en África como en América; mientras que *Trypanosoma cruzi* causante de la enfermedad de Chagas está ampliamente distribuidos en el continente Americano (Marquardt *et al.*, 1990).

De acuerdo con evidencia proveniente de secuencias de RNAr, los cinetoplástidos constituyen un taxón monofilético. Se considera que los euglénidos (*Euglena gracilis*), son los organismos más cercanos a los cinetoplástidos, en virtud de sus semejanzas metabólicas y estructurales, a pesar de que carecen de cinetoplasto (Stevens *et al.*, 2001; Vickerman y Preston, 1976). Evidencia variada indica que los

cinetoplástidos forman uno de los linajes eucariontes que divergieron más tempranamente después de la adquisición de mitocondria (Stevens y Gibson, 1999; Stevens *et al.*, 2001) (figura 1).

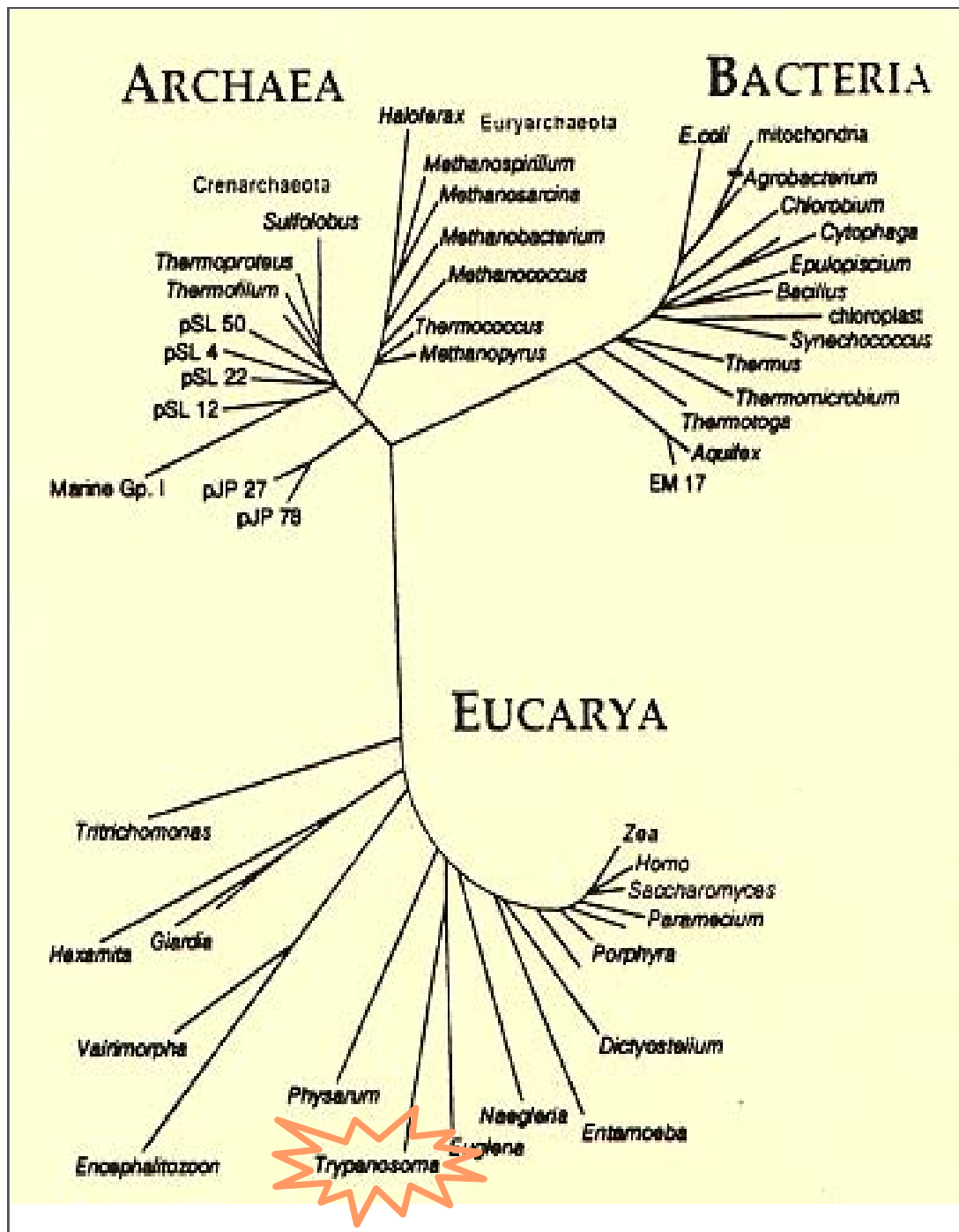


Figura 1: Posición del género *Trypanosoma* en un árbol filogenético basado en la secuencia del RNAr de la subunidad menor.



El orden cinetoplástida se subdivide en tres familias: Trypanosomatidae, Bodonidae y Cryptobiidae (Vickerman y Preston, 1976). De estas familias los miembros de las dos últimas típicamente tienen dos flagelos heterodinámicos y aunque la mayoría de ellos son habitantes de ambientes acuáticos de vida libre, en estas dos familias también hay organismos ecto y endo parásitos de vertebrados e invertebrados, especies representantes de estas familias son *Bodo caudatus* y *Trypanoplasma borreli*. Por otro lado, en la familia Trypanosomatidae todos los miembros tienen un flagelo y todos son parásitos de vertebrados, invertebrados y de plantas con flor, estas características sugieren que el ancestro común a las tres familias tuvo que ser un organismo de vida libre (Stevens *et al.*, 2001) que adquirió la condición de parásito en el curso de su evolución.

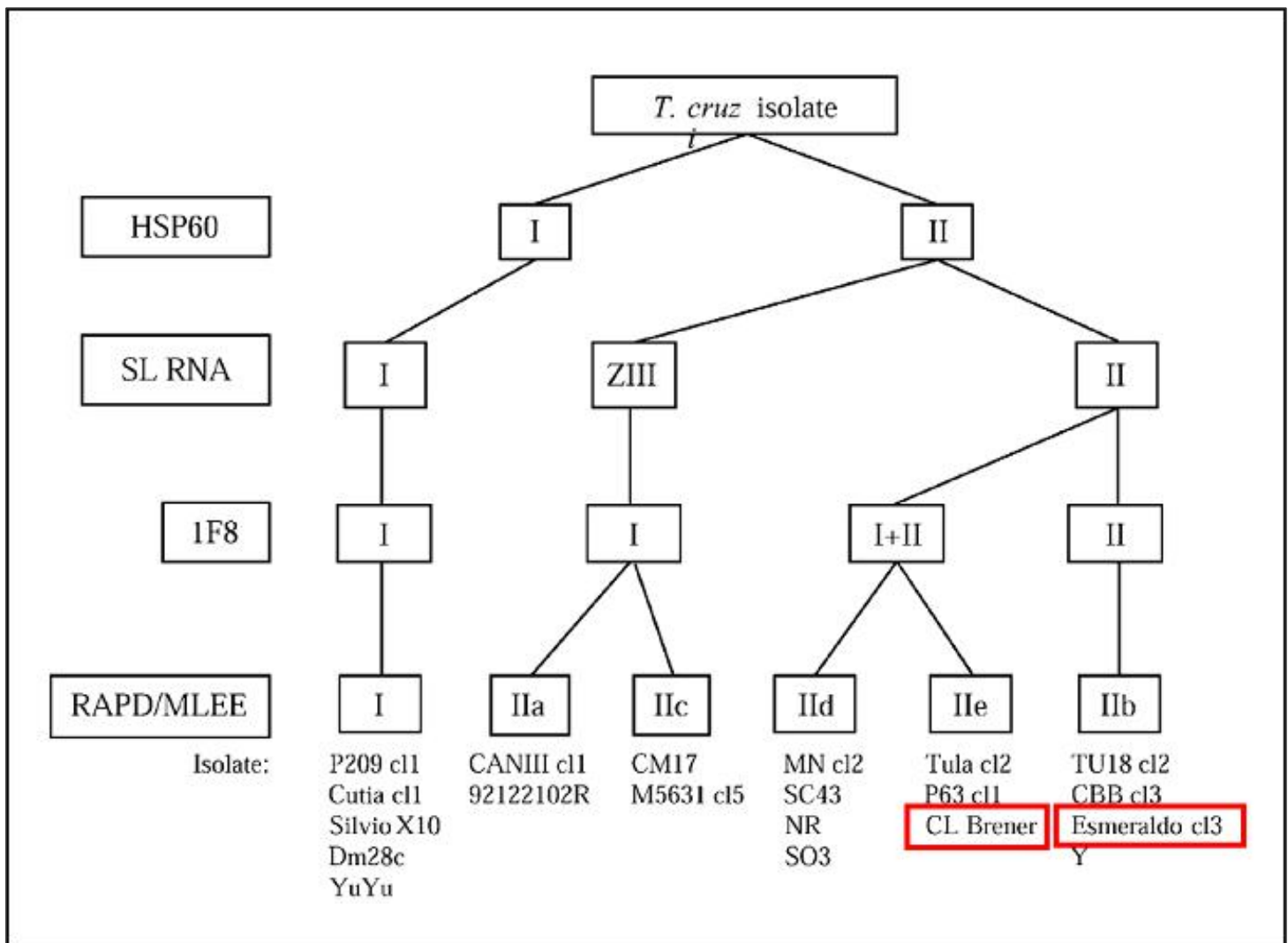
La familia Trypanosomatidae se divide en dos clados principales: i) el género *Trypanosoma* y ii) los géneros *Leishmania*, *Phytomonas*, *Endotrypanum*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia* y *Blastocrithidia* (Alvarez *et al.*, 1996). Por su parte, dentro del género *Trypanosoma*, se distinguen dos grandes grupos o secciones: los Salivaria y los Stercoraria. Esta clasificación se basa en el sitio dentro del insecto vector en el cual se desarrollan los parásitos (Marquardt *et al.*, 1990). Los Salivaria se desarrollan en la sección anterior del vector y se transmiten al huésped por medio de inyección cuando el insecto se alimenta de sangre, este es el caso de *Trypanosoma brucei*; mientras que los Stercoraria se desarrollan en la sección posterior del vector, dentro del intestino y son transmitidos al huésped en las heces del insecto, este es el caso de *Trypanosoma cruzi*.

### 1.1.1.1 CLASIFICACIÓN DE *Trypanosoma cruzi*, UN TAXÓN, VARIOS GRUPOS

Aunque *Trypanosoma cruzi* está descrito como un solo taxón, se trata de una especie que muestra mucha heterogeneidad particularmente a nivel de genotipo, esto resulta muy extraño para un organismo cuya reproducción es de tipo clonal (Dvorak, 1984; Tibayrenc *et al.*, 1986). Originalmente el taxón *T. cruzi* se encontraba dividido en tres grupos llamados zimodemas, debido a que se basaban en diferencias en la movilidad electroforética de grupos de isoenzimas (Miles *et al.*, 1978). El zimodema I se relacionó con mamíferos arbóreos como tlacuaches o zarigüeyas, mientras que el zimodema II se asoció a aislados provenientes de pacientes humanos de enfermedad de Chagas así como mamíferos domésticos (perros, ratones y ratas) junto con triatóminos. El zimodema III se encontró en animales selváticos terrestres como armadillos. Análisis filogenéticos más profundos que empleaban un mayor número de marcadores enzimáticos así como un mayor número de aislados señalaron que el nivel de heterogeneidad era todavía mayor y que podía ser segregada en dos grandes linajes que se nombraron unidades discretas de tipificación (DTU por sus siglas en inglés) 1 y 2 (Anonymous, 1999, Robello *et al.*, 2000). La DTU 1 no pudo ser sub-estructurada en grupos, pero la DTU 2 se subdividió en cinco sub-linajes (2a al 2e) (Tibayrenc y Ayala, 1988). Las estructuras poblacionales de *T. cruzi* son esencialmente clonales, sin embargo se ha encontrado un alto número de cepas híbridas, es decir que tienen contribuciones génicas de más de un linaje. Una cepa híbrida puede ser homóciga para algún alelo

particular y al mismo tiempo ser heterociga para otros. Un ejemplo de cepa hbrida es la CL Brener que fue la elegida para el proyecto del genoma de *T. cruzi*, esta cepa pertenece al DTU 2e (Sturm *et al.*, 2003). Mediante anlisis exhaustivos que emplean mltiples marcadores gnicos se ha probado que esta cepa tiene contribuciones de al menos 3 sub-linajes: DTU 1, DTU 2b y 2c (fig. 2) (Westenberger *et al.*, 2005; Westenberger *et al.*, 2006). Por otro lado, la cepa Esmeraldo es un representante de DTU 2b; ste es uno de los parentales del DTU 2e, se trata de un grupo considerado homocigo y la secuencia de su genoma se est realizando con el fin de poder lograr el ensamblaje correcto de las secuencias genmicas para CL Brener (El Sayed *et al.*, 2005 b). Con estas herramientas es posible hasta cierto punto determinar el origen taxonmico de un alelo particular dentro de esta cepa.

En el presente proyecto se emplearon dos aislados de *T. cruzi*: La determinacin del arreglo gnico del locus de la proteina ribosomal S4 se hizo sobre un aislado perteneciente a la cepa Tulahuén, mientras que los trabajos enfocados a determinar los niveles de RNA se hicieron empleando un aislado de la cepa CL-Brener .

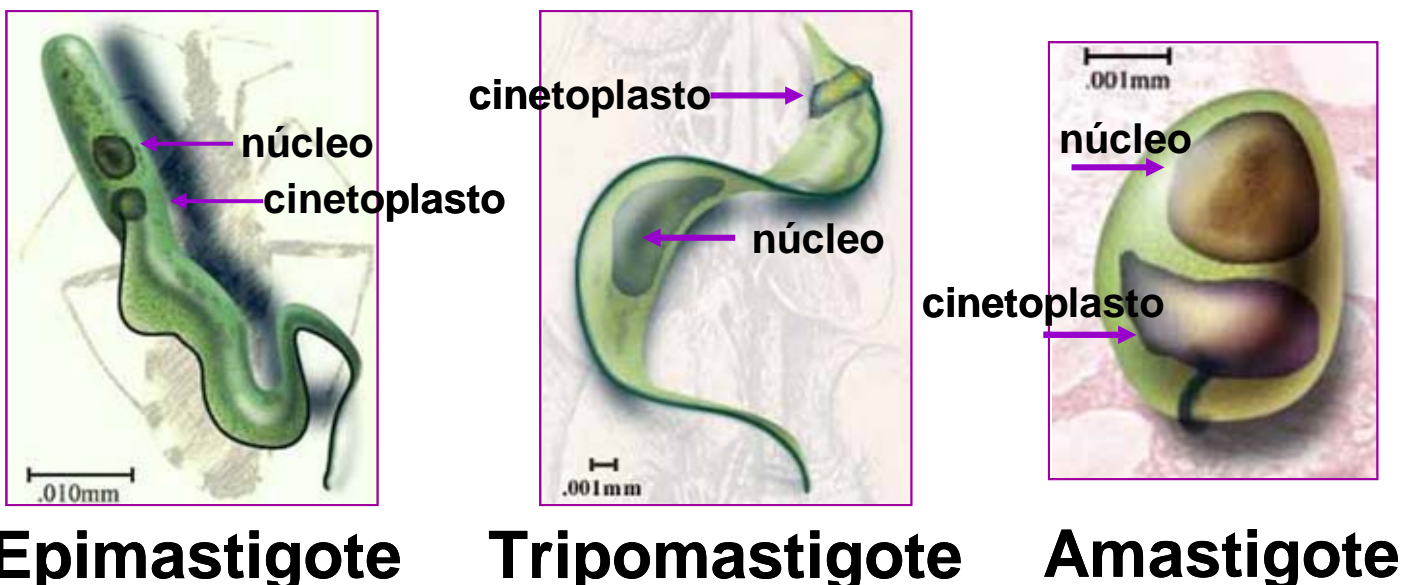


**Figura 2: División del taxón *Trypanosoma cruzi* en dos principales linajes I y II.**

El linaje II se subdivide en cinco sub-linajes. Debajo de cada sub-linaje se pueden ver algunas de las cepas que se han aislado y caracterizado. En los recuadros del lado izquierdo se observan los distintos marcadores moleculares usados para hacer la tipificación del taxón (HSP60: proteína de choque térmico de 60 kDa; SL RNA: RNA del "spliced leader");. En los rectángulos rojos se destacan las cepas CL-Brener y Esmeraldo. Figura tomada de Sturm *et al.*, 2003.

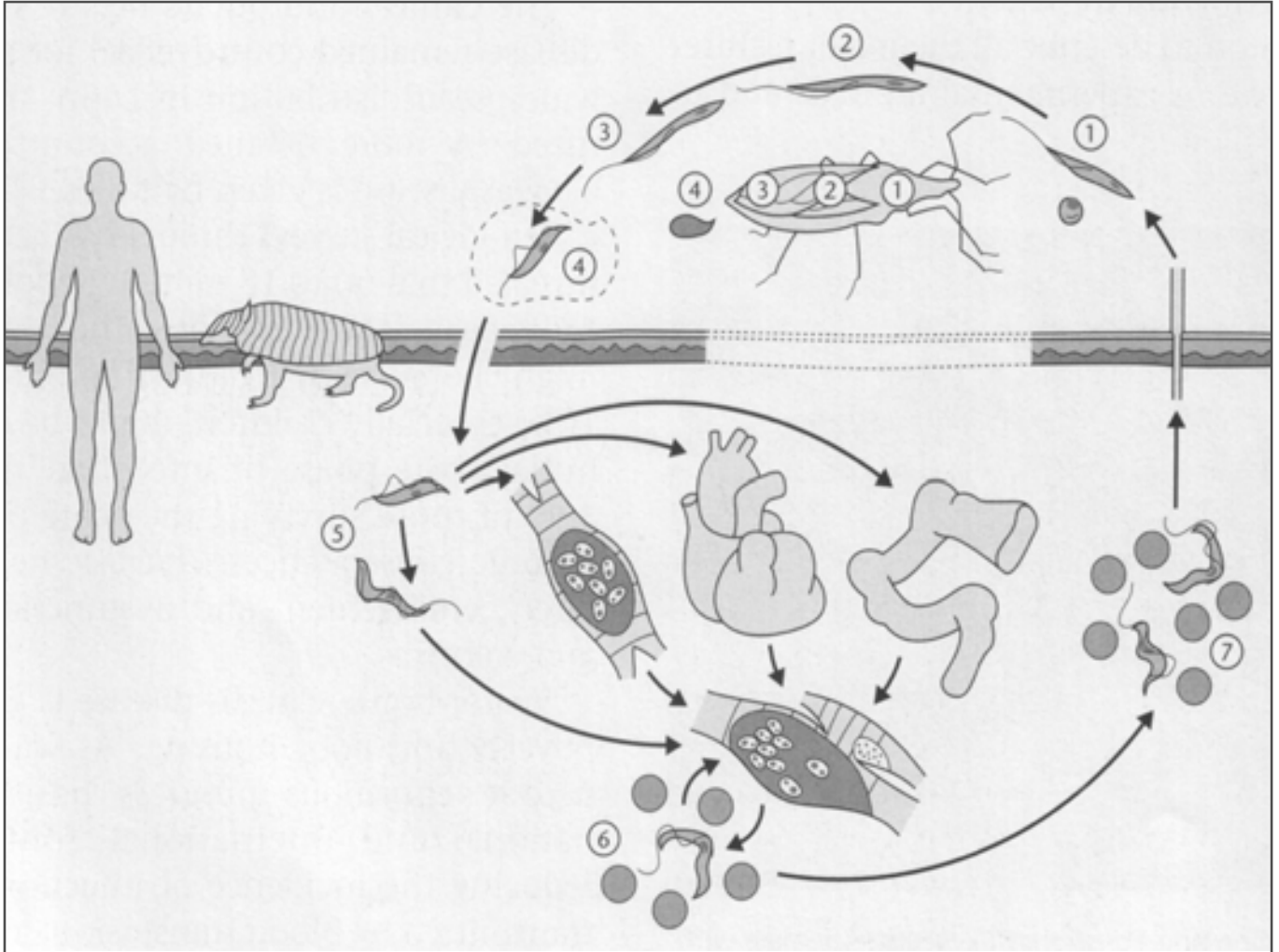
### 1.1.2 CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*

En su mayoría los cinetoplástidos tienen ciclos de vida muy complejos, en ellos participa con frecuencia un insecto vector y algún hospedero vertebrado (Vickerman, 1985). Ese es el caso de *T. cruzi*, su ciclo de vida se desarrolla en dos hospederos, uno de ellos es el vector transmisor: insectos hematófagos Triatómidos de la familia Reduviidae, (chinchas besuconas) (fig. 6 a) y algunos vertebrados mamíferos (Tyler y Engman, 2001). A lo largo del ciclo se pueden distinguir al menos tres formas biológicas o estadios de diferenciación: epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes. El reconocimiento de estas formas deriva tanto de la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo como del tamaño del flagelo (Souza, 1999). En epimastigotes el cinetoplasto se encuentra entre el núcleo y el flagelo, en tripomastigotes se localiza delante del núcleo, mientras que los amastigotes tienen un flagelo incipiente (fig. 3).



**Figura 3: Formas biológicas del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.** En epimastigotes el núcleo se encuentra posterior al cinetoplasto, mientras que en tripomastigotes es anterior. En amastigotes el flagelo es incipiente. Imágenes de [www.uta.edu/chagas](http://www.uta.edu/chagas).

El ciclo de vida puede iniciar cuando el insecto vector ingiere, de un vertebrado infectado, sangre que contiene tripomastigotes circulantes. Estos se diferencian a epimastigotes y se replican en el intestino del insecto, posteriormente se adhieren a través del flagelo al epitelio de la pared del recto del insecto y se transforman en tripomastigotes metacíclicos (Bonaldo *et al.*, 1988). Los tripomastigotes son la forma infectiva y son expulsados en las heces del vector, este evento suele coincidir con los tiempos en que el insecto se alimenta. Esta es una característica de las especies de chinches que son vectores muy efectivos (Marquardt, *et al.*, 1990). Los tripomastigotes entran al huésped mamífero cruzando a través de las mucosas oral, nasal o la conjuntiva o a través de heridas en la piel cercanas al punto de picadura del insecto e incluso a través del orificio de la misma picadura (Tyler y Engman, 2001). Una vez en el mamífero los tripomastigotes, que no son replicativos, invaden prácticamente cualquier tipo de célula nucleada en tan poco tiempo como 20 minutos. Ya en el interior de la célula los tripomastigotes se re-diferencian a amastigotes, éstos se dividen hasta por 9 ciclos y llenan el citoplasma completamente en cuatro a cinco días (Araújo-Jorge, 1999). Poco antes de que la célula sea reventada por la abundancia de parásitos éstos se re-transforman a tripomastigotes, los cuales se liberan por la ruptura celular (Marquardt *et al.*, 1990). Los tripomastigotes circulantes pueden perpetuar la infección mediante la invasión de una nueva célula o bien iniciar un nuevo ciclo por la intervención de una chinche (Tyler y Engman, 2001) (fig. 4).



**Figura 4: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*:** El ciclo inicia cuando una chinche de la familia Reduviidae ingiere sangre de un individuo infectado (7,1). Los tripomastigotes circulantes se transforman en epimastigotes una vez en el insecto (2,3). Los epimastigotes se rediferencian a tripomastigotes metacíclicos antes de salir en las heces del vector (4). En el mamífero los tripomastigotes invaden prácticamente cualquier célula nucleada (5) y se retransforman a amastigotes. Los amastigotes que se multiplican en la célula, cambian morfológicamente a tripomastigotes circulantes (6), éstos pueden continuar la parasitemia al invadir una nueva célula o iniciar un nuevo ciclo por intervención de una chinche (7).

Existen especies animales que actúan como reservorios de *T. cruzi* como son gatos, cerdos, ardillas, tlacuaches, mapaches y armadillos, siendo este último el más importante. Los reservorios son especies que a pesar de estar infectados con el parásito no desarrollan la enfermedad, por eso es que juegan un papel muy importante en la persistencia de la enfermedad dentro de las comunidades.

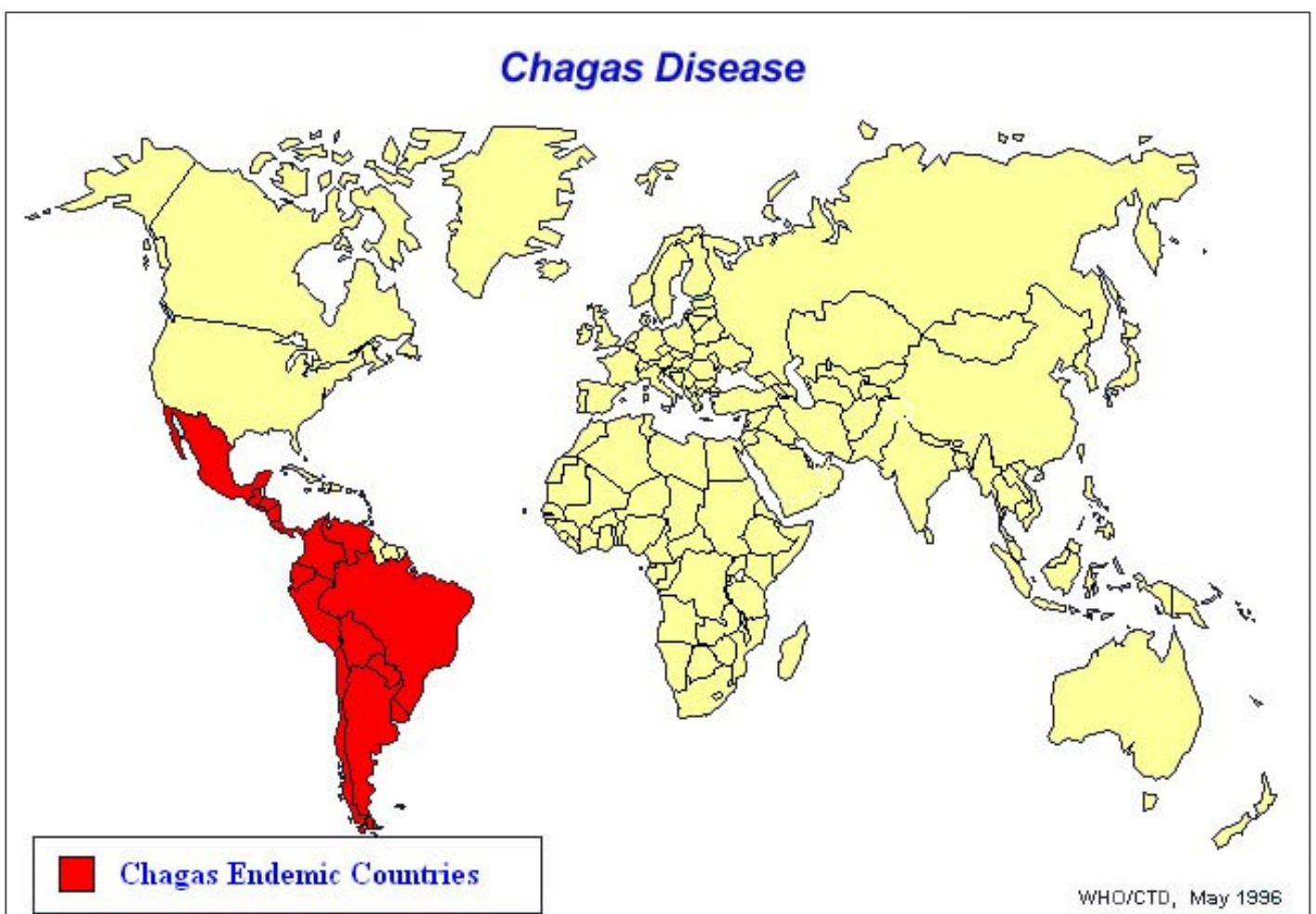
Durante cada etapa del ciclo de vida ocurre expresión diferencial de algunos genes, particularmente de proteínas de superficie; por ejemplo la proteína de superficie mucina se expresa exclusivamente en la forma de epimastigote, mientras que en el resto de los estadios la proteína no se expresa (Di Noia *et al.*, 2000). Este es el mismo caso de FL-160 que se expresa solamente en tripomastigotes pero no en epimastigotes (Weston *et al.*, 1999). Este tipo de genes son llamados de expresión estadio específica y la regulación de los mismos debe ser finamente controlada de forma que *T. cruzi* pueda adaptarse a los cambios de hospedero y los cambios de condiciones ambientales que eso implica (Clayton, 2002).

### **1.1.3 ENFERMEDAD DE CHAGAS**

El estudio de *Trypanosoma cruzi* desde el punto de vista médico es muy importante ya que es el agente causal de la enfermedad de Chagas (Chagas, 1909, Chagas, 1922). Este mal se distribuye exclusiva pero de forma muy amplia en el continente Americano, ya que se han reportado casos desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Argentina (fig. 5). De acuerdo con estudios serológicos realizados a



través de América Latina alrededor de 18 millones de personas podrían estar infectados (WHO, 2002). Se estima que el 10% podría morir en la fase inicial de la enfermedad, de los sobrevivientes alrededor del 30% vivirá con las consecuencias de la fase crónica de la enfermedad como son la enfermedad cardíaca Chagásica y el agrandamiento y disfunción del esófago y colon (Burri y Brun, 2003).



**Figura 5: Mapa de la distribución de la enfermedad de Chagas.**  
Tomado de [www.who.int/ctd/chagas](http://www.who.int/ctd/chagas).

### **1.1.3.1 Transmisión**

Como se vio en el ciclo de vida, los parásitos entran en el huésped vertebrado cuando los tripomastigotes presentes en las heces del insecto hematófago se internalizan a través de una herida o por las mucosas del humano. Cuando esto ocurre suele presentarse un edema; si el portal de entrada es el ojo, se puede observar el signo de Romaña que es un edema peri-oftálmico unilateral acompañado de conjuntivitis (fig. 6 b). Además de la forma de transmisión por intervención del vector reduviedo, también se ha documentado la infección por vía congénita (transplacentaria). De acuerdo con algunos reportes, esta forma de infección ocurre en alrededor del 1% de los niños de madres seropositivas. La infección por ingestión de la leche de la madre infectada se presenta en muy raras ocasiones. El contagio por transfusiones con sangre infectada así como por transplante de órganos infectados también ha sido reportado (Burri y Brun, 2003).

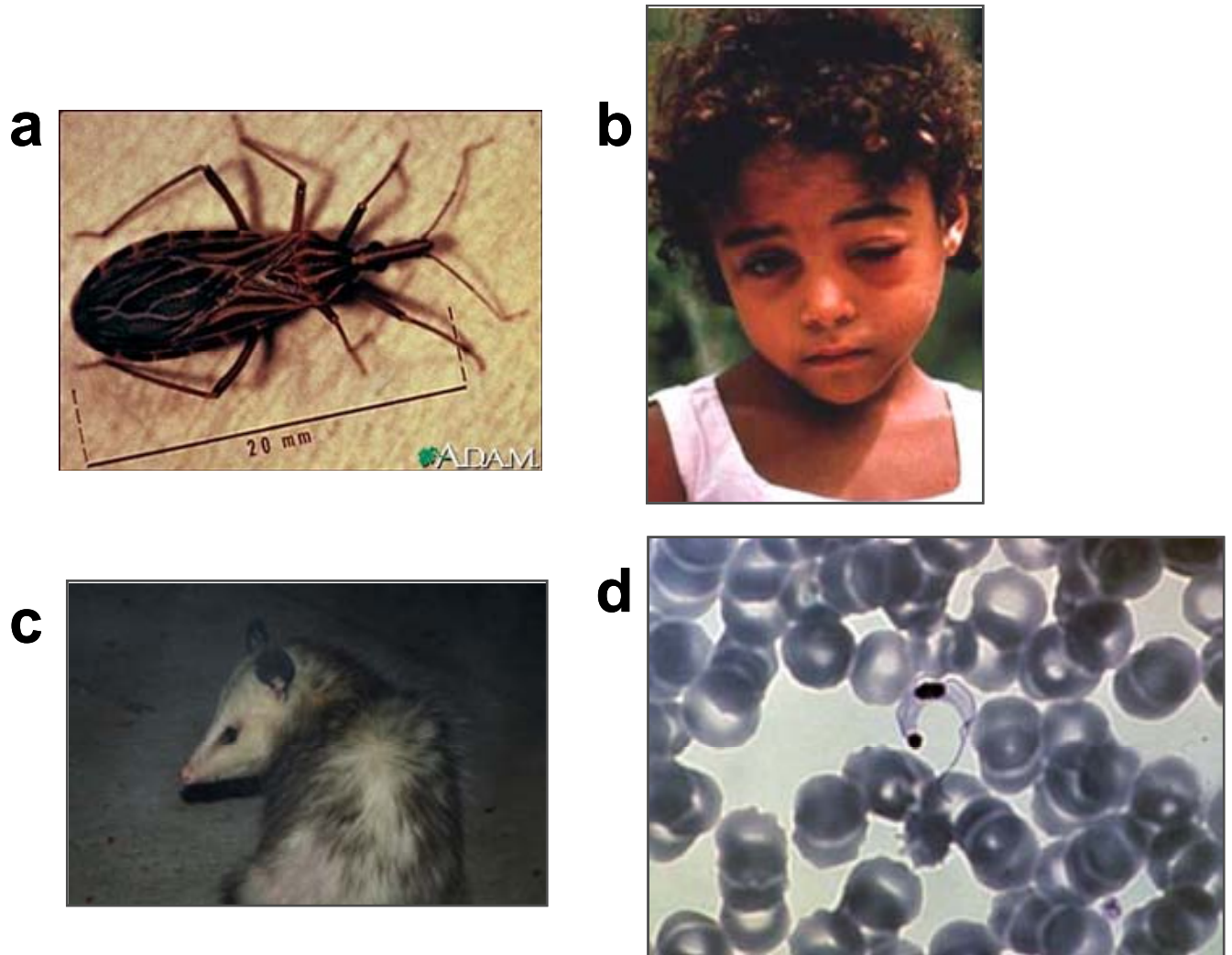
### **1.1.3.2 Desarrollo de la enfermedad**

La enfermedad transcurre en dos etapas, una inicial también llamada aguda y la fase crónica. La fase aguda, cuya duración varía de dos semanas a varios meses, se caracteriza por presentar los siguientes síntomas clínicos: linfadenopatía generalizada, fiebre, mialgia, dolor de cabeza, edema facial generalizado, vómito, diarrea, así como anomalías electrocardiográficas (Andrade, 1999). En los casos en los que durante esta etapa se presenta la miocarditis aguda ésta suele ser fatal. Meningoencefalitis es una rara complicación en adultos; mientras que la

hepatoesplenomegalia es una complicación común en infecciones adquiridas vía congénita (Burri y Brun Miles, 20032).

A pesar de que el hospedero puede morir durante la fase aguda esto es raro en pacientes adultos. Cuando la etapa aguda de la enfermedad desaparece se inicia la fase crónica, esta fase es de duración indefinida, y puede extenderse por toda la vida del paciente. Durante esta fase se presenta fuerte evidencia de inmunidad a *T. cruzi*, sin embargo los individuos tienden a permanecer infectados lo que indica que una pequeña proporción de los parásitos son exitosos en evadir la respuesta inmune (Andrade, 1999). En estos enfermos se localizan células parasitadas así como focos de inflamación crónica en el corazón y en tejido extra-cardíaco. La intensidad de las lesiones varía de caso en caso, aunque normalmente es leve. El evento más dramático en la patogénesis de la enfermedad de Chagas es el desarrollo de miocarditis fibrosa crónica, esto ocurre sin un cambio aparente del estatus inmunológico del paciente y suele presentarse después de un prolongado periodo asintomático. Mientras que esta progresiva reacción inflamatoria se genera solamente en el corazón, es posible mediante estudios histológicos encontrar formas de *T. cruzi* en músculo liso de diversos órganos como glándulas adrenales, útero, vejiga y esófago. En todos esos casos la presencia del parásito se acompaña de una leve infiltración mononuclear focal, mientras que en el corazón además se reporta una severa destrucción del miocardio. Este nivel de la enfermedad solo es desarrollado en el 30 al 40% de los infectados. Una pequeña proporción de pacientes pueden presentar anormalidades en el tracto digestivo, más comúnmente

en esófago y colon y se presentan como síntomas la regurgitación y la pérdida de peristálsis, cuyo grado de severidad varía (Burri y Brun, 2003).



**Figura 6: Aspectos de la enfermedad de Chagas:** a) ejemplar de la familia Reduviidae, todas las especies de esta familia son potenciales vectores transmisores de *T. cruzi*. b) Infante con signo de Romaña, inflamación peri-oftálmica que ocurre como consecuencia de la infección vía la mucosa ocular. c) Tlacuache (*Didelphis virginiana*), el reservorio de mayor importancia epidemiológica en México. d) El método de diagnóstico de infección con *T. cruzi* es la observación directa de tripomastigotes en sangre.

### **1.1.3.3 Diagnóstico**

El diagnóstico de la enfermedad se realiza en la fase aguda y se logra a partir de la observación al microscopio del parásito en muestras de sangre (fig. 6d), esto se acompaña de la evaluación clínica de signos y síntomas. También existen análisis serológicos (ELISA) y otros que emplean herramientas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estos análisis permiten hacer la detección del parásito de forma más rápida y precisa (Marquardt, 1990).

### **1.1.3.4 Situación de la enfermedad de Chagas en México**

Debido a las condiciones climatológicas de México se registra una amplia variedad y presencia de vectores, de particular importancia se encuentran *Triatoma barberi*, *T. dimidiata* y *T. gerstaeckeri* (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006). Por otro lado en la distribución de la enfermedad participan dos factores de forma preponderante: la presencia del vector y la estrecha convivencia de éste con la población humana. En este último factor influyen las condiciones socio-económicas de la población humana ya que algunos tipos de vivienda característicos de zonas pobres (chozas), favorecen que los insectos vivan ahí mismo, y debido a que algunas de las especies son organismos de hábitos nocturnos, pasan desapercibidos durante el día y durante la noche se alimentan de los habitantes de la casa ampliando la posibilidad de infectarlos con el parásito. Este último factor ha ocasionado que la enfermedad sea endémica en algunos estados del país (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006). Los organismos que actúan como reservorios son importantes en la persistencia de la

enfermedad en las comunidades. En México los reservorios más importantes son los perros así como tres especies de tlacuaches (*Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *Philander opossum*) (fig. 6 c). Es de cierta consideración que en México no se reportan todos los casos existentes de enfermedad de Chagas, ya sea por localizarse lejos de los servicios de salud o bien porque no existe un lineamiento oficial que obligue el registro y seguimiento de estos casos. Por lo anterior es que Cruz-Reyes y Pickering-López (2006) consideran que deberían implementarse políticas específicas para tener un mejor conocimiento del número real de personas infectadas y enfermas además de un programa enfocado al abatimiento de las poblaciones de los insectos que actúan como vectores.

## **1.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS RELEVANTES DE *T. cruzi***

Además del interés médico que genera el grupo biológico al que pertenece *T. cruzi* estos organismos también han motivado estudios de biología básica debido a que presentan algunos mecanismos atípicos en la expresión de su genoma. Brevemente se pueden mencionar alguno de ellos.

### **1.2.1 Edición post-transcripcional de RNA mensajeros mitocondriales**

El DNA mitocondrial en *T. cruzi* es tan abundante que constituye alrededor del 30% del DNA total. Este DNA se encuentra en un arreglo de moléculas circulares concatenadas que semeja una cota de malla. Aquí se hallan dos tipos de moléculas,

los mini-círculos y los maxi-círculos (Estevez y Simpson, 1999). Una mitocondria contiene en promedio de 5,000 a 10,000 mini-círculos cuyo tamaño va de 0.5 a 2.5 Kb, mientras que solo tiene aproximadamente 50 maxi-círculos con tamaños que oscilan entre 20 a 40 Kb. En los mini círculos se encuentran las secuencias codificadoras para los RNA guías (RNAg) que son fundamentales en el proceso de edición de RNA (Schneider, 2001). Por otro lado los maxi-círculos corresponden al DNA mitocondrial de cualquier otro organismo ya que en ellos se encuentran codificados seis sub-unidades del complejo I, apocitocromo B de la Co-Q-citocromo C reductasa del complejo III, tres sub-unidades de la citocromo oxidasa (complejo IV), sub-unidad A6 de la ATP sintetasa (complejo V), proteína ribosomal S12, así como genes de RNAr (9S y 12S), todos estos elementos necesarios para el ensamblaje apropiado de la cadena respiratoria y de los ribosomas mitocondriales (Scheffler, 1999).

Al igual que ocurre en otros genomas mitocondriales la transcripción es policistónica, por lo que se genera un transcrito primario muy largo. De los 18 genes del maxi círculo 12 son cripto-genes es decir sus transcritos no tienen sentido hasta que son editados. Durante la edición se adicionan o remueven uridinas dentro del transcrito primario. La posición donde las uridinas son agregadas o removidas depende de la secuencia de los RNAg (Adler y Hajduk, 1994). Estos transcritos son moléculas pequeñas que miden de 55 a 70 nt. En su estructura estos RNAs contienen una secuencia de 4 a 18 nt llamada "secuencia de anclaje" que es complementaria con algunas regiones del pre-RNAm. Existen de 300 a 400 RNAg diferentes dependiendo de la especie y la diversidad de estas moléculas presentes

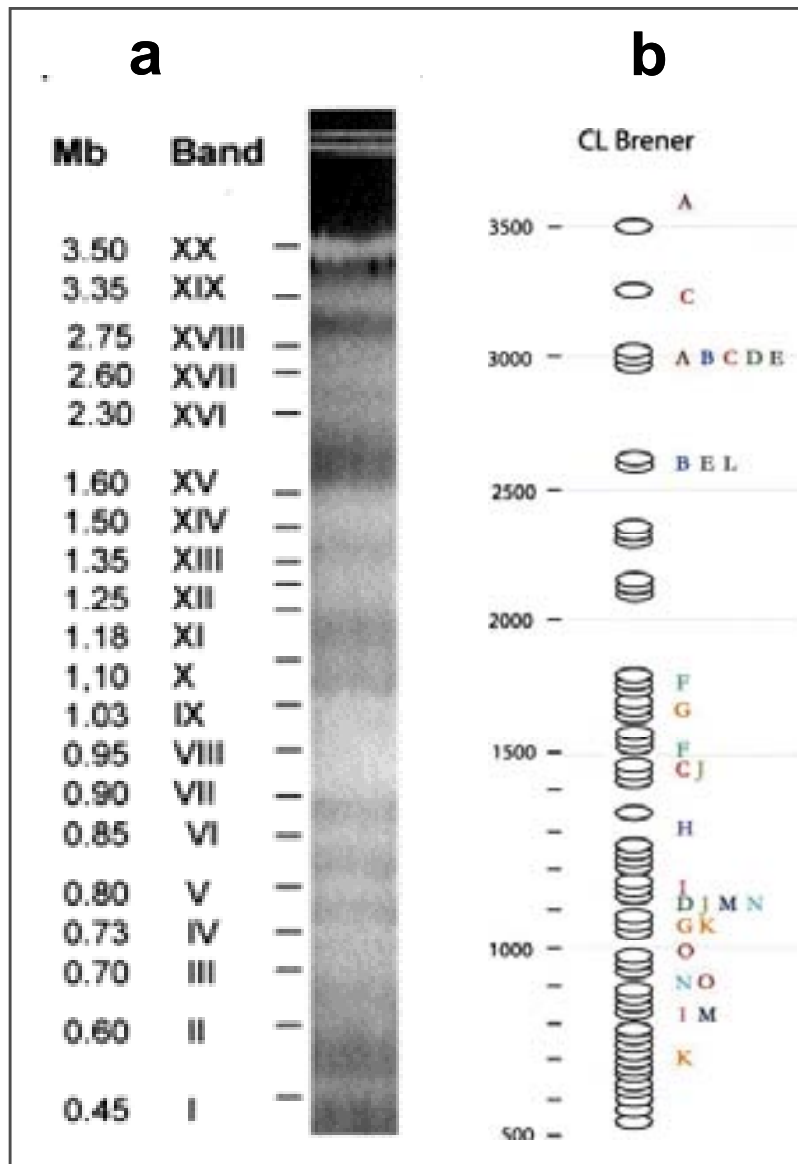
en un organismo correlaciona directamente con lo extenso del proceso de edición (Robinson y Gull, 1991). Los sitios en que se establece la complementariedad entre esos dos RNAs señalan los puntos en que se deben adicionar o eliminar Us. Para que lo ocurra anterior se recluta un complejo en el que hasta el momento se han identificado los siguientes componentes: una endo ribonucleasa dependiente de RNAg (que corta en los puntos de unión del RNAg con el RNAm precursor); la enzima uridilil transferasa terminal (TUTasa), que adiciona Us; una exonucleasa 3'-5' específica de U, que remueve Us del RNAm precursor, y finalmente se ha detectado una RNA ligasa que une los fragmentos editados (Estevez y Simpson, 1999). A este complejo se le ha denominado editosoma y aunque aquí se han nombrado algunas de las actividades de sus componentes, el poder proporcionar un modelo detallado de los mecanismos involucrados en su función es todavía prematuro.

### **1.2.2 Arquitectura genómica**

Los cromosomas de cinetopláستidos no se condensan durante la división celular. No fue sino hasta la aplicación de electroforesis en campos pulsados que éstos se hicieron evidentes como moléculas discretas de DNA (Swindle y Tait, 1996). En *T. cruzi* se han resuelto así ~28 cromosomas, cuyos tamaños abarcan de 300 Kb a 3.5 Mb (fig. 7). El tamaño total del genoma diploide de este organismo, cuya secuencia fue liberada en el año 2005, mide entre 106.4 y 110.7 Mb de lo que se estima que posee alrededor de 12,000 genes por genoma haploide. En él se encuentran dispersos genes que codifican pre-RNAr, RNAt, RNA pequeños



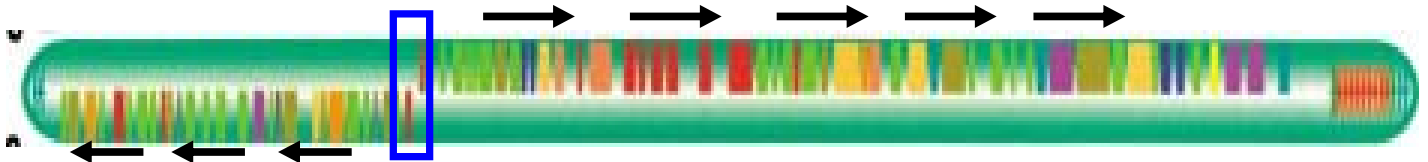
nucleares (snRNA), RNA pequeños nucleolares (snoRNA), RNA que codifica el spliced leader (ver adelante), así como para RNAm (El Sayed *et al.*, 2005 b).



**Figura 7: Cariotipo de *T. cruzi*.** a) bandas cromosomales de *T. cruzi* separadas en un gel de agarosa. b) Identificación de las bandas cromosomales de la cepa CL Brenner. Algunos cromosomas homólogos no migran a la misma distancia, esto se debe en ocasiones a la presencia de elementos móviles, o por duplicaciones y/o deleciones génicas.

Con alguna excepción, los genes codificadores de proteínas carecen de intrones y están generalmente arreglados en grupos grandes que incluyen decenas a cientos de genes, aunque no existe una relación o semejanza funcional entre ellos (Clayton,

2002). Dentro de estos grupos todos los genes mantienen la misma polaridad entre sí por lo que se encuentran codificados en la misma hebra de DNA (Myler *et al.*, 1999). Esta es una característica a la fecha solo descrita en los genomas de tripanosomátidos (El Sayed *et al.* 2005 a) (fig. 8).



**Figura 8: Arquitectura genómica de tripanosomátidos:** Representación esquemática de los genes presentes en el cromosoma 1 de *L. major* Friedlin. Las flechas negras indican la dirección de los genes. Los genes que comparten la misma orientación están arreglados en tandem, uno seguido de otro, separados entre si por pequeñas regiones intergénicas. El área enmarcada en el rectángulo no contiene genes, pero incluye una posible secuencia promotora que tal vez dirija la transcripción de los dos grupos de genes adyacentes. Tomado de Myler P. *et al.*, 1999.

En estos genomas es común encontrar genes altamente repetidos, de hecho se calcula que por lo menos el 50% del genoma de *T. cruzi* consta de secuencias repetidas, en su mayoría pertenecientes a familias génicas de proteínas de superficie, retro transposones y repeticiones subteloméricas (tabla 1) (El Sayed *et al.*, 2005 b). Otro rasgo particular de los genomas de tripanosomátidos es el alto grado de sintenia (conservación del orden de los genes), entre las diferentes especies (Bringaud, 1998), esto puede deberse a la escasa ocurrencia de recombinación sexual de estos organismos, ya que esencialmente sus poblaciones mantienen una estructura clonal (Heckert *et al.*, 1994; Tibayrenc, 1995). Aquellos puntos dentro del genoma en donde se rompe la sintenia obedecen a sitios en que ha habido

duplicación de algunos genes; es interesante que el grado de conservación entre estas copias repetidas es mayor dentro de un mismo haplotipo que entre haplotipos lo que indica que estas expansiones génicas son un evento reciente (El Sayed *et al.*, 2005 b).

**Características generales del genoma anotado de *T. cruzi*.**

Tamaño del genoma en pb	<b>60,372,297</b>
% G+C	<b>51</b>
% G+C en región codificadora	<b>53.4</b>
% G+C en región intergénica	<b>47</b>
Número de genes	<b>22,570</b>
Pseudogenes	<b>3,590</b>
Densidad de genes (genes / Mb)	<b>385</b>
Tamaño promedio de regiones intergénicas (pb)	<b>1,024</b>
<b>Genes de RNA</b>	
RNA <sub>t</sub>	<b>115</b>
RNA <sub>r</sub>	<b>219</b>
RNA SL	<b>192</b>
snRNA	<b>19</b>
snoRNA	<b>1447</b>
<b>Familias génicas con mayor número de copias presentes en el genoma</b>	
<i>Trans</i> sialidasa	<b>1430 (693)</b>
MASP	<b>1373 (433)</b>
Mucina	<b>863 (201)</b>
proteasas de superficie (gp63)	<b>425 (251)</b>
RNA helicasas (eIF-4a)	<b>70</b>
glicosil transferasa	<b>52</b>

**Tabla 1: Resumen del genoma anotado de *T. cruzi*.** Para genes de RNA y de proteínas el número corresponde al número de copias; encerrado en ( ) se ve el número de pseudogenes. MASP: proteína de superficie asociada a mucina; gp63: glicoproteína de 63 kDa.; eIF-4: factor de iniciación 4. Modificado de El sayed *et al.* 2005

### 1.2.3 Transcripción y su regulación

Como en otros eucariontes en *T. cruzi* hay tres RNA polimerasas que transcriben RNAs de diferente naturaleza. Éstas se describen comparativamente con los de eucariontes superiores.

- RNA polimerasa I: transcribe RNAr, en el caso particular de algunas especies de tripanosomátidos también transcribe algunas proteínas de superficie (Das y Bellofato, 2004).
- RNA polimerasa II: genera RNAm, en tripanosomátidos además transcribe un RNA pequeño llamado mini-exón o spliced leader (Gillinger y Bellofato, 2002).
- RNA polimerasa III produce RNAt, snRNA, snoRNA así como el RNAr 5S (Palenchar y Bellofato, 2006).

A diferencia de lo que ocurre en eucariontes superiores, donde los genes codificadores de proteínas son transcritos de manera individual, en tripanosomátidos se transcriben a partir de grandes unidades policistrónicas. La transcripción de estas unidades policistrónicas no es gobernada por un promotor clásico (Palenchar y Bellofato, 2006), más bien se considera que la transcripción es constitutiva de manera general. A pesar de esto, RNAs codificados en la misma unidad transcripcional pueden no presentar el mismo nivel de expresión, esto último es controlado por mecanismos post transcripcionales como se detalla más adelante (Teixeira, 1998). Es aceptado que la transcripción inicia de forma específica en un punto río arriba de los grupos de genes (unidades transcripcionales) descritos

anteriormente (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004). Sin embargo, también se ha encontrado un inicio de transcripción no específico, en experimentos realizados con plásmidos transfectados donde se ha demostrado que la RNA polimerasa II de cinetoplástidos es capaz de iniciar la transcripción de manera inespecífica (Clayton, 1999, Martínez-Calvillo *et al.*, 1997). El análisis de la estructura primaria de la RNA polimerasa II reveló que el extremo C-terminal de la subunidad mayor es diferente del de sus homólogos en eucariontes superiores, ya que carece de una repetición de hepta-péptidos definido por los aminoácidos Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser, característica común en eucariontes superiores e indispensable para la viabilidad celular (Chapman y Agabian, 1994). Esta característica es precisamente lo que permite el reconocimiento específico de la región promotora clásica.

La RNA polimerasa II de cinetoplástidos también transcribe un RNA pequeño de ~150 nt llamado mini-exón o “spliced leader” (SL). El SL se encuentra en todos los RNAm maduros en el extremo 5', su función se describe más adelante. La transcripción de este RNA pequeño es monocistrónica y dirigida por el único promotor que se ha descrito para esta polimerasa en cinetoplástidos (Gillinger y Bellofatto, 2002).

Por otro lado, la transcripción por RNA polimerasa I es regulada a través de un promotor; éste ha sido detalladamente descrito en diferentes cinetoplástidos (Hernández *et al.*, 1988, Janz y Clayton, 1994, Uliana *et al.*, 1996, Martínez-Calvillo y Hernández, 1994) y esencialmente posee una arquitectura similar a sus homólogos

en eucariontes superiores (Figueroa-Angulo *et al.*, 2006). La RNA polimerasa I de algunas especies de cinetoplástidos además tiene la capacidad de generar RNAm, como es el caso de *Trypanosoma brucei* en donde transcribe los RNAm de una glicoproteína variable de superficie (VSG) así como de la proteína repetitiva de ácido procíclico (PARP), las dos son proteínas de superficie y su expresión es estadio específica ya que las dos no se expresan a un mismo tiempo (Das y Bellofatto, 2004). Son proteínas que le permiten al organismo evadir a sistema inmune de sus hospederos (Pays *et al.*, 1994).

En cuanto a la RNA polimerasa III, ésta transcribe los RNAs de transferencia (RNAt), el RNAr 5S así como los snRNA, ricos en uridina, presumiblemente de manera similar a como lo hacen sus homólogos en eucariontes superiores.

#### **1.2.4 *Trans* –splicing**

Mientras que el *cis* splicing es una reacción intramolecular en la que se remueven las secuencias correspondientes a los intrones de un gen y se unen los exones entre sí para generar un RNAm maduro y funcional, el *trans*-splicing es una reacción intermolecular de procesamiento de RNA, en ésta dos moléculas independientes de RNA son unidas para formar un transcrito colinear (Ullu E. *et al.*, 1996). Los participantes de esta reacción son por un lado un RNAm precursor y por otro lado el RNA pequeño de 120 nucleótidos que contiene los 39 nt del llamado “spliced leader” (Boothroyd y Cross, 1982).

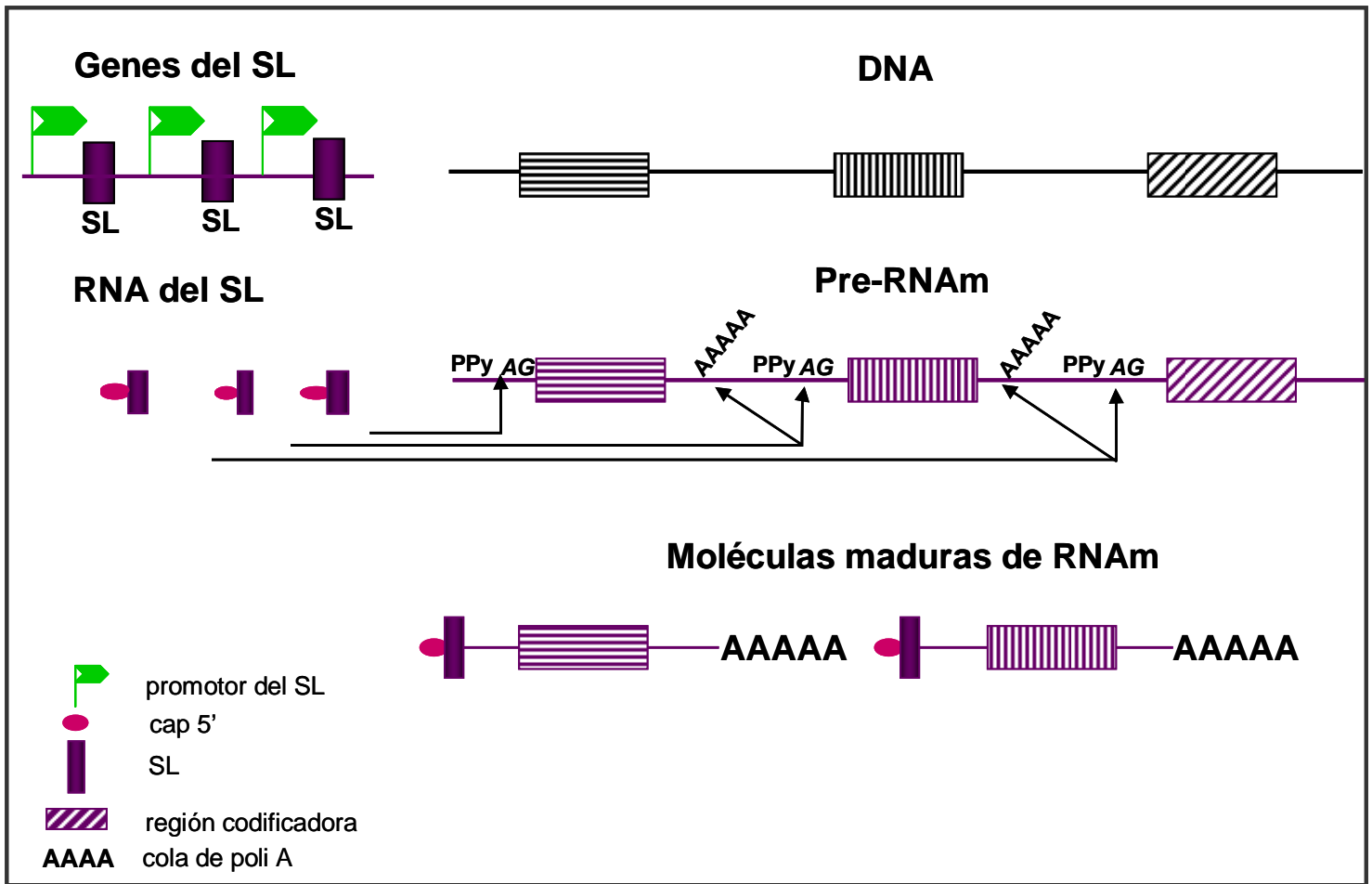
El “spliced leader” (SL) se sintetiza en una región particular del genoma, donde se encuentran alrededor de 200 copias organizadas en tandem (Agabian, 1990). A diferencia de lo que ocurre con los genes codificadores de proteínas, cada una de estas copias es transcrita de forma independiente, debido a que cada copia posee su propio promotor así como espaciadores no transcritos localizados entre copias (Campbell, 2000, Zeiner *et al.*, 2004). La transcripción de este RNA pequeño equivale al 6% de la producción total de RNA (Campbell, 2000). El transcrito primario del SL es modificado en su extremo 5': Se le agrega la estructura llamada “cap” de mensajeros eucariontes, que consiste de una 7-metil guanosina (m7ppG), adicionalmente las cuatro primeras bases también son metiladas tanto en el azúcar como en la base, este extremo 5' hipermetilado es llamado estructura 4-cap (Lücke *et al.*, 1996). La adición de los grupos metilo es indispensable para llevar a cabo la reacción de trans splicing. Estas modificaciones del extremo 5' lo habilitan para ser reconocido por el ribosoma una vez que se ha ligado al extremo del RNAm (fig. 9) (Zamudio *et al.*, 2006). El SL recién transcrito mide 120 nt de longitud, posteriormente ocurre un recorte que reduce su longitud a 39 nt, excepto en *Leptomonas collosoma* en donde mide 41 nt. De esta manera se obtiene un SL maduro listo para poder agregarse al extremo 5' de todos los RNAm del organismo (Zeiner *et al.*, 2004; Teixeira, 1998).

En la reacción de trans-splicing participan dos RNAs: el SL y el RNAm precursor que se unen covalentemente para formar un RNAm maduro. A pesar de que esta reacción no se ha dilucidado por completo se sabe que en ella participan ribonucleo proteínas pequeñas nucleares (snRNP) que contienen snRNA homólogos



de U2, U4 y U6 (Ullu *et al.*, 1996). Se presume también que las proteínas que se encuentran en estos complejos son homólogas de las que participan en el cis-splicing de vertebrados (Ullu *et al.*, 1996). La adición del SL ocurre en sitios específicos dentro de las regiones intergénicas, río arriba de cada región codificadora pertenecientes al pre-RNA<sub>m</sub>. Estos sitios específicos consisten de un di-nucleótido AG localizado río abajo de una región rica en poli-pirimidinas (fig. 9). Este di-nucleótido es el sitio aceptor de splicing, es decir es el punto en que el SL es ligado al RNA<sub>m</sub> (Campbell, 2000).

En la maduración de los RNA<sub>m</sub> de tripanosomas además del trans splicing es necesaria la poliadenilación del extremo 3', estos procesos se encuentran estrechamente relacionados pues se sabe que son ejecutados por el mismo complejo enzimático. A diferencia de lo que pasa en otras especies de eucariontes, en cinetoplastidos no hay una señal de poliadenilación que dirija este proceso, la elección del sitio de poliadenilación de un RNA<sub>m</sub> particular está dirigida por el sitio aceptor de splicing del gen que se encuentra río abajo (fig. 9). Por ello esta reacción solo puede ocurrir dentro de un intervalo de distancia de no más allá de un par de cientos de nucleótidos. De hecho algunos autores especulan que el sitio aceptor de splicing es el sustituto de la señal de poliadenilación de eucariontes superiores (López-Estrano *et al.*, 1998).



**Figura 9: *Trans* splicing.** La adición del “spliced leader” (SL) inicia con la transcripción del mismo en alguna de las 200 copias presentes en el genoma de *T. cruzi*. Este RNA pequeño es modificado en su extremo 5' con una guanósina hipermetilada (círculo rojo). Por otro lado en las regiones intergénicas de los RNAm primarios (Pre-RNAm), hay regiones ricas en pirimidinas (PPy), éstas son reconocidas por la maquinaria de splicing para realizar un corte. En un dinucleótido AG localizado río abajo del sitio de corte se lleva a cabo la unión del SL. Esta misma maquinaria de splicing realiza la poliadenilación del RNAm localizado río arriba. El sitio de poliadenilación se elige aparentemente siguiendo un criterio de distancia con respecto al sitio de *trans*-splicing río abajo. Cada RNAm maduro queda conformado por la secuencia del miniexón, seguido de una región no traducida en 5' (5' UTR), el marco de lectura abierto, la región no traducida en 3' (3' UTR) y la cola de poli A.

El proceso de trans-splicing y poliadenilación ocurre en cada región intergénica y es el mecanismo por el que se generan RNAm individuales a partir del transcrito primario precursor. El RNAm maduro contiene entonces el “cap” en 5’, el SL, la región no traducida en 5’ (5’ UTR), el marco de lectura abierto, la región no traducida en 3’ (3’ UTR) y la cola de poli A (fig. 9).

De esta manera se piensa que la función del proceso de trans splicing es la adquisición del cap en todos los RNAm para posibilitar su traducción, aunque también es posible que en tripanosomátidos la maquinaria de traducción co-evolucionó con la secuencia del SL, haciendo el inicio de la traducción dependiente de la secuencia del SL; adicionalmente el cap en 5’ es al igual que en otros eucariontes, una estructura que favorece la estabilidad del RNAm. En experimentos en los que se ha inhibido la reacción de *trans*-splicing se ha descrito una vía de degradación específica para mensajeros sin SL así como la falta de acumulación de los mismos (Tschudi y Ullu, 1990). Finalmente, la salida del RNAm del núcleo podría requerir la adición del SL, ya que éste es la característica de una molécula de RNAm madura (Ullu *et al.*, 1996).

## 1.3 REGULACIÓN POST TRANSCRIPCIONAL; METABOLISMO DE RNAm

De forma general primero se describirán los puntos susceptibles de regulación post transcripcional que inciden sobre el RNAm en eucariontes superiores y a continuación se mencionará lo correspondiente en tripanosomátidos.

### 1.3.1 EN EUCARIONTES SUPERIORES

Es frecuente que en diferentes regiones de un RNAm se encuentren señales reguladoras. Aún cuando estas señales pueden encontrarse dentro de la región codificadora, es más común que se localicen en las regiones no traducidas de los extremos 5' y 3' de la molécula, 5' UTR y 3' UTR por sus siglas en inglés (Day y Tuite, 1998). Estas señales reguladoras (elementos en *cis*) son reconocidas por una variedad de factores que actúan en *trans*. Los factores en *trans* son proteínas o RNAs pequeños no codificadores que se asocian al RNA y una vez unidos dirigen y/o realizan diferentes eventos del procesamiento de los RNAm. Aunque un mismo elemento en *cis* puede ser reconocido por más de un elemento en *trans* el reconocimiento es específico. A continuación se describen eventos del procesamiento de RNAm potencialmente regulados por efectores moleculares.

**1.3.1.1 Splicing:** Los genes en eucariontes superiores se componen de exones espaciados entre si por secuencias no codificadoras o intrones. Se ha descrito al llamado "spliceosoma" como la maquinaria molecular que realiza los pasos para la

eliminación de intrones y empalme de exones para generar mensajeros maduros codificadores. Un conjunto de proteínas y RNAs pequeños es capaz de identificar los límites entre exón e intrón de forma específica, aunque en algunos genes la combinación resultante de exones puede variar de acuerdo con etapas del desarrollo a esto se le llama splicing alternativo. Por este proceso es posible la generación de diferentes isoformas proteicas a partir de un mismo gen. La elección de exones a unir depende de las proteínas de splicing presentes. Algunas de éstas funcionan como represores, que “bloquean” un área del RNAm mediante su unión a él impidiendo así su reconocimiento por parte de la maquinaria de splicing. Otras son activadores que estimulan el splicing de regiones específicas. En ocasiones la sola presencia o ausencia de un regulador es suficiente para determinar una vía particular de splicing alternativo.

**1.3.1.2 Poliadenilación:** La poliadenilación o adición de adeninas en el extremo 3' de un RNAm es una condición indispensable en su maduración para su transporte al citoplasma, además esta estructura participa favoreciendo la traducción (Dreyfus y Regnier, 2002; Keller y Martin, 2002). El proceso de poliadenilación es dirigido por el reconocimiento de una señal consenso localizada en el pre-RNAm, para mamíferos es el hexa-nucleótido AAUAAA que se encuentra de 10 a 30 nucleótidos río arriba del sitio donde se adiciona el poli A (Zhao *et al.*, 1999). Adicional a la primera poliadenilación que se da en el núcleo, este evento puede repetirse en el citoplasma. El fenómeno de poliadenilación secundaria o citoplásmica se ha descrito para algunos RNAm particularmente de genes regulados por el desarrollo en levaduras, mamíferos y *Caenorhabditis elegans* (Keller, 2002; Kwak *et al.*, 2004). Estos RNAm

después de ser poliadenilados por primera vez en el núcleo son exportados al citoplasma donde permanecen con una cola corta de poli A en una forma “durmiente”, es decir no se integran a polisomas. En su “activación” algunas señales ambientales estimulan la elongación de la cola de poli A lo que favorece la traducibilidad del RNAm (Sheet, 1995; Kuraishi *et al.*, 2000, Stoeckle y Guan, 1993, Wang *et al.*, 2002). La poliadenilación citoplásmica o secundaria es realizada por una nueva familia de poli A polimerasas llamada GLD-2, descritas por Wang *et al.* en el 2002. Este evento de poliadenilación hace posible la producción de proteínas sin el requerimiento de una ronda transcripcional inmediata anterior (Keller, 2002).

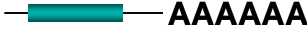
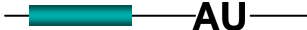

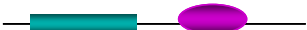
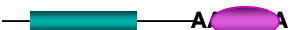


**1.3.1.3 Estabilidad del RNAm:** Mientras el RNAm precursor emerge de la maquinaria transcripcional, interacciona con una variedad de proteínas que modulan diferentes procesos (Dreyfuss *et al.*, 2002, Bentley, 2005). Algunas de estas proteínas regulan la vida media del RNAm. La estabilidad o inestabilidad de un RNAm es una consecuencia de la interacción que establece el RNA con elementos regulatorios que actúan en *cis* y *trans* (cuadro 1). La presencia de algunos elementos en *cis* específicos es determinante para la estabilidad del RNAm, ejemplos de esto son el cap en posición 5' y la cola de poli A. El cap, que no es más que una guanosina metilada en su posición 7', se enlaza al primer nucleótido transcrito vía un inusual enlace trifosfato 5'-5' e impide el reconocimiento de este extremo por parte de exoribonucleasas 5'-3'. En cuanto a la cola de poli A, se le ha asignado un papel como determinante de estabilidad del RNAm debido a dos observaciones, i) la remoción de la cola de poli A es el primer paso en el decaimiento de muchos RNAm, ii) la interacción de la proteína de unión a poli A (PABP) con esta

estructura del RNAm previene su rápida destrucción *in vitro* (Garneau *et al.*, 2007; Parker y Song, 2004, Deutscher, 2006, Mangus *et al.*, 2003).

De manera contraria a estos dos elementos estabilizantes existen también otras estructuras cuya presencia promueve la rápida degradación del RNAm. Ejemplos de estas son los elementos ricos en adenilato y uridilato (AREs). La evidencia de que los AREs funcionan como elementos desestabilizadores proviene de un estudio en el que una secuencia conservada de 51 nt conteniendo motivos AUUUA del 3' UTR del RNAm del factor estimulador de colonia de granulocito fue insertada en el 3' UTR del RNAm de  $\beta$ - globina, naturalmente estable. El resultado fue la desestabilización específica de este mensajero (Chen y Shyu, 1994; Chen y Shyu, 1995; Shaw y Kamen 1986). Experimentos posteriores han permitido la descripción de otros elementos con esta propiedad desestabilizadora (Chen y Shyu, 1995). Las proteínas PUF son otro ejemplo de elemento desestabilizador del RNAm. El nombre deriva de los primeros miembros que fueron descritos: **Pumilio** en *Drosophila melanogaster* y **FBF** en *C. elegans* de aquí que sean nombrados como PUF o Pum-HD (Wickens *et al.*, 2002). Los miembros de esta familia proteica regulan eventos de diferenciación en múltiples organismos. Estas proteínas son muy divergentes entre sí aunque todas comparten ocho repeticiones consecutivas de aproximadamente 40 aminoácidos; este grupo de repeticiones es esencial para el reconocimiento de RNA y para interactuar con otros efectores. Mientras estas repeticiones se encuentren presentes e intactas la proteína será funcional no importa el grado de divergencia del resto de la proteína (Wickens *et al.*, 2002). Las proteínas PUF se unen a señales

presentes en el 3' UTR de algunos mensajeros donde se estimula su degradación o bien interfieren con su traducción.

## Determinantes de estabilidad de RNAm en eucariontes

DETERMINANTE	RNAm	EFEECTO
<b>Elementos en <i>cis</i></b>		
• Cola de Poly A.		Estabiliza al RNAm. Su ausencia genera la rápida degradación del RNA.
• Elementos ricos en AU (ARES)		Generalmente desestabilizan al RNAm favoreciendo el reconocimiento por endo ribonucleasas.
• Elementos ricos en GC (GRES)		
<b>Elementos en <i>trans</i></b>		
• Proteínas de asociación a cola de poli A o a secuencia específica: familia PuF, TcUBP	 	La proteína de asociación a cola de poli A impide la degradación del RNAm desde 3'.
• Proteínas que reconocen alguna estructura secundaria específica	 	Otras proteínas son estabilizadoras o favorecedoras de la degradación de forma específica y su actividad es alterada por su asociación a otras proteínas.

**Cuadro 1: Determinantes de estabilidad del RNAm en eucariontes.** En rectángulos se representa la región codificadora en un RNAm; también se indican en breve los elementos en la región no traducida en 3' que son reconocidos por elementos en *trans*, en óvalos. Modificado de Ross. 1995.

**1.3.1.4 Degradación:** Los RNAm de eucariontes contienen en su estructura dos determinantes de estabilidad: el cap en el extremo 5' y la cola de poli A en 3', ambos incorporados post transcripcionalmente. Estas dos estructuras interactúan con dos proteínas, el factor de iniciación de la traducción eucarionte (eIF4E) y la proteína de unión a poli A (PABP) respectivamente. El transcrito resulta así protegido de la actividad enzimática de exo nucleasas (cuadro 1 y fig. 10). Para que inicie el



decaimiento de un RNAm alguna de estas dos estructuras debe verse comprometida, o bien debe darse un ataque endonucleolítico. La vía principal de degradación de RNAm inicia con el acortamiento de la cola de poli A; este paso es reversible y aquellos transcritos con las señales correctas son re-adenilados y así pueden ser incorporados en polisomas para su traducción. La degradación del RNAm se inicia al menos por dos vías distintas. Por un lado el CAP en 5' es removido en un proceso conocido como "decapping", lo que permite que el RNA sea degradado en dirección 5'-3' por la exoribonucleasa *Xrn1*. Por otro lado cuando la remoción de la cola de poli A es total, entonces se permite el acceso al RNA desde el extremo 3' por un complejo de exoribonucleasas 3'-5' llamado exosoma (Van Hoof y Parker, 2002). Estas dos rutas no son excluyentes y la contribución relativa de cada una se halla todavía sujeta a debate (Garneau *et al.*, 2007).

Sobre la regulación de las actividades de desadenilación se sabe poco. Se han descrito varios complejos de desadenilasas eucariontes incluyendo PAN2-PAN3, CCR4-NOT y PARN, cada una con propiedades particulares. Esta variedad sugiere redundancia, pero es posible que cada una sea reclutada a blancos específicos o que muestren restricción espacial o temporal (Parker y Song, 2004).

La degradación de RNA a partir del extremo 3' se realiza por el complejo molecular llamado exosoma. Este es un oligómero de 10 a 12 subunidades, algunas de las cuales poseen actividad de exoribonucleasas, otras poseen motivos conservados de RNA helicasas. No es claro si todas las subunidades son catalíticamente activas o si algunas participan únicamente en el reconocimiento del sustrato y/o en el

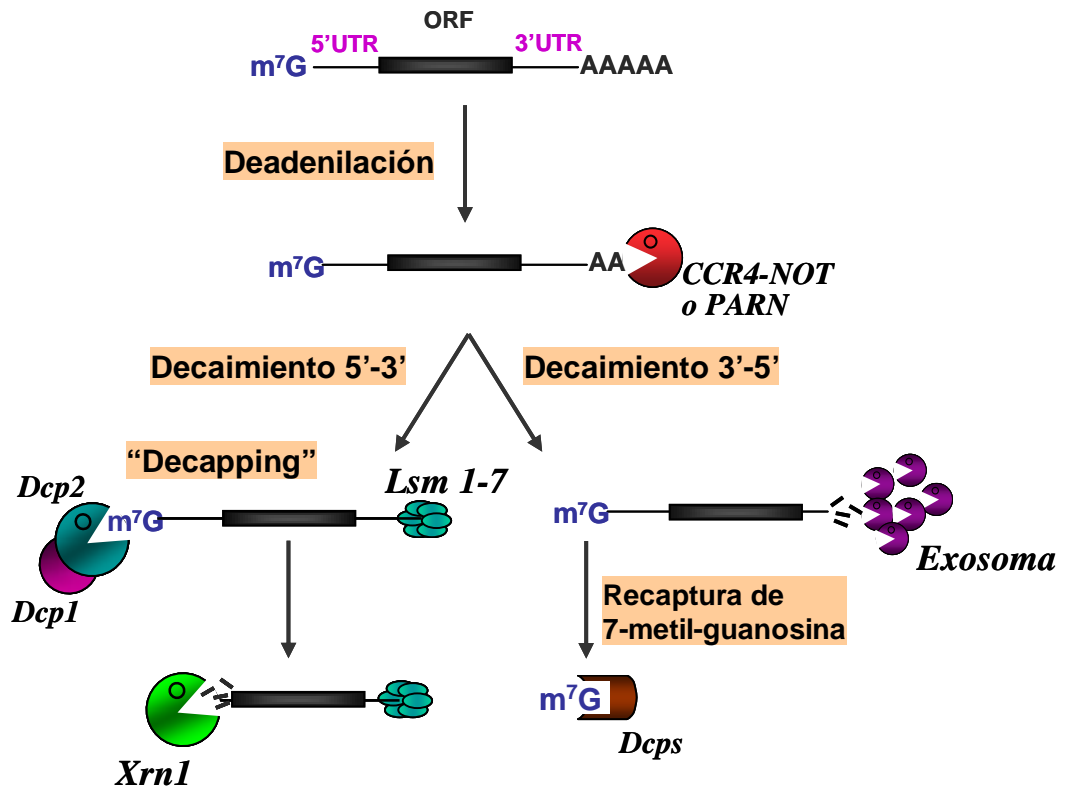
posicionamiento del mismo dentro del exosoma. A continuación del decaimiento 3'-5', el CAP en 5' presente todavía en el RNA residual es cortado por la enzima DcpS. En eucariontes superiores, ésta parece ser la vía mayor de degradación de RNAm (Garneau *et al.*, 2007).

El exosoma participa también en el procesamiento en 3' del pre RNAr 18S y de otros RNAs no codificadores para dar lugar a sus formas maduras (Butler, 2002).

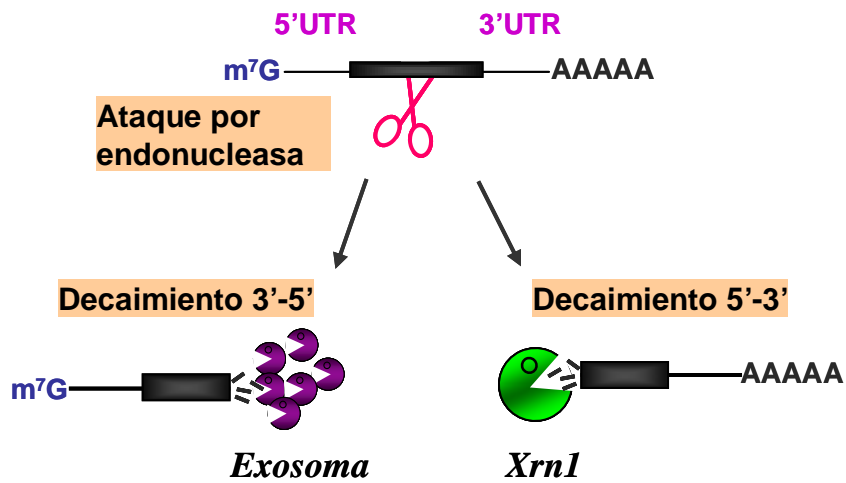
El decaimiento de un RNAm desde su extremo 5' inicia con la remoción del CAP, aparentemente es necesario primero un acortamiento de la cola de poli A. El complejo que elimina el CAP está formado por el dímero Dcp 1-Dcp2. Además existen múltiples proteínas accesorias que facilitan su actividad, entre ellas el complejo de proteínas Lsm 1-7. A su vez la actividad de "decapping" es aumentada por la presencia de Edc1p y Edc2p o proteínas estimuladoras del "decapping". Finalmente esta actividad es inhibida por la presencia de eIF4E asociada al CAP y es estimulada por la presencia de AREs en la secuencia del RNAm (Stoeckling *et al.*, 2006). Una vez que se han eliminado tanto el CAP como la cola de poli A entonces ocurre la degradación del RNAm desde 5' por la exonucleasa *Xrn 1* (fig. 10 a). En *Saccharomyces cerevisiae* *Xrn 1* es la exonucleasa citoplásmica más importante en la degradación de RNAm (Stoeckling *et al.*, 2006). Mutantes de enzima ven comprometida de forma global su regulación al ser incapaces de remover oportunamente poblaciones enteras de RNAs los cuales así continúan siendo traducidos (Parker y Song, 2004).

A pesar de que las vías principales de degradación de RNAm inician desde los extremos, algunos RNAm inician su degradación con ataques endonucleolíticos, particularmente aquellos cuyas tasas de degradación son reguladas por estímulos externos específicos como cantidad de hierro intracelular o presencia de hormonas como estrógeno. En esta vía de degradación, las estructuras secundarias dentro del RNAm tienen un papel determinante para ser reconocidas de forma específica por su respectiva endonucleasa. Se piensa que una vez que la endonucleasa hace un primer corte dentro del RNAm, los fragmentos resultantes son degradados por exonucleasas desde los extremos de la molécula (fig. 10 b). Algunas de las pocas endoribonucleasas identificadas se asocian a complejos polisomales que se encuentran ensamblados sobre el RNAm blanco. La actividad de la endonucleasa es inhibida por la asociación de proteínas estabilizadoras del RNAm situadas en el sitio de corte. Ante una señal ambiental reconocida, el estabilizador se disocia y la endonucleasa corta el RNA deteniendo rápidamente su traducción (Garneau *et al.*, 2007).

### a) Decaimiento dependiente de desadenilación



### b) Decaimiento independiente de desadenilación



**Figura 10: Rutas de decaimiento de RNA en eucariontes superiores.** **a)** Decaimiento dependiente de desadenilación: inicia con la remoción de la cola de poli A por el complejo CCR4-Not o por la desadenilasa PARN. El RNA desadenilado puede ser atacado por los dos extremos. La falta de cola de poli A activa la pérdida del cap en 5', por la acción de Dcp1 y Dcp2, después *Xrn 1* degrada el resto. Desde 3' la degradación se lleva a cabo por el exosoma. Finalmente Dcp S recicla el cap (7-metil guanosina). **b)** En el decaimiento independiente de desadenilación participa primero una endonucleasa que reconoce específicamente un sitio de corte. De los dos fragmentos de RNA resultantes uno carece de cola de poli A, lo que favorece el ataque del exosoma; el otro carece de "cap" lo que permite el libre ataque de *xrn1*. Esta modalidad de degradación normalmente ocurre en RNAm de vida corta que normalmente son regulados por señales que controlan el ciclo de vida. Modificado de Garneau *et al.*, 2007.

Se han descrito focos citoplásmicos de naturaleza granular llamados cuerpos P ricos en diferentes efectores del metabolismo de RNA: RNAm poli A+, PABP1, componentes de la vía de decaimiento 5'-3' como factores de "decapping" y *Xrn 1*, maquinaria de desadenilación, así como los factores iniciadores de la traducción eIF4E y eIF4G2 (Garneau *et al.*, 2007). Los cuerpos P son de naturaleza transitoria, que al parecer se forman cuando el sistema de degradación de RNAm se ve sobrecargado o bien cuando se presenta algún estrés celular (deprivación de nutrientes o fase estacionaria). Se ha sugerido que los cuerpos P están funcionalmente involucrados en actividad de "decapping", represión de la traducción, represión mediada por micro-RNA y empacamiento de partículas virales (Cougot *et al.*, 2004). Debido a que algunos RNAm pueden salir de cuerpos P, se estima que estas estructuras podrían tener un papel en el secuestro de RNAm y no sólo ser sitios de decaimiento (Coller y Parker, 2005). El secuestro de RNAm en cuerpos P puede ser una forma de compartamentalizar aquellos RNAs que están "marcados"

para ser degradados e impedir que se reasocian a conjuntos polisomales (Bregues *et al.*, 2005).

### 1.3.2 EN TRIPANOSOMÁTIDOS

En tripanosomátidos aparentemente no hay un control individual sobre la transcripción de los genes codificadores de proteínas por lo que la regulación de su expresión es fundamentalmente post-transcripcional (Teixeira, 1998; Clayton, 2002). La información que se tiene sobre estos mecanismos de control de la expresión en estos organismos proviene principalmente de estudios realizados en genes que solo se expresan en un estadio del ciclo de vida o bien de genes cuya expresión es controlada por el ciclo celular (Abuin *et al.*, 1999; Di Noia *et al.*, 2000; Irmer y Clayton, 2001; Boucher *et al.*, 2002; Sbicego *et al.*, 2003, Recinos *et al.*, 2001). A continuación se comenta sobre eventos potencialmente reguladores de los RNAm de cinetoplastos.

**1.3.2.1 *Trans* splicing:** En tripanosomátidos solo son reconocidos por el ribosoma los RNAm que han adquirido en su extremo 5' el SL, ya que éste es el portador del CAP. En el pre-RNAm existen señales que dirigen la adición del SL, lo que posiciona la cola de poli A del RNAm codificado río arriba (Ullu *et al.*, 1993). Uno de los cuestionamientos que se tiene con respecto al *trans*-splicing es si éste ocurre de forma cotranscripcional o posterior a que el RNAm emerja completamente. De acuerdo con algunos trabajos esto no es igual para todos los mensajeros, pues en algunos la adición del SL ocurre tan pronto como emergen los primeros 50-60 nt de

la región 3' no traducida (Ullu *et al.*, 1993), pero en otros mensajeros las señales que dirigen este proceso pueden permanecer “enmascaradas” por lo que es posible ver precursores del RNAm sin SL y/o sin cola de poli A por un tiempo, hasta un punto fisiológico no reconocido, para que se complete la maduración del mensajero y ocurra el *trans*-splicing (Jäger *et al.*, 2007). En este mismo trabajo se propone que la reacción de *trans* splicing también puede ocurrir en el citoplasma y no solo en el núcleo y que esto puede ser un evento adicional de regulación post-transcripcional en estos organismos.

**1.3.2.2 Poliadenilación:** Aunque este es un evento vinculado con el *trans* splicing no se conoce el mecanismo preciso por el cual se realiza la elección del sitio de poliadenilación, o cómo la misma maquinaria que hace el *trans* splicing también es capaz de añadir la cola de poli A (Ullu *et al.*, 1993). Se ha descrito que un RNAm puede ser poliadenilado independientemente en más de un sitio, lo que genera 3' UTR con pequeñas diferencias. Por esto es posible que alguno de estos 3'UTR contenga señales que podrían ser reconocidas por algún elemento en *trans* que altere la estabilidad del RNAm.

Por otro lado, en *T. brucei* se han encontrado homólogos para GLD2, esta proteína descrita originalmente en *C. elegans* (Wang *et al.*, 2002) tiene actividad de poli A polimerasa citoplásmica. Se sabe que esta enzima regula la expresión de algunos genes, especialmente aquellos cuya expresión es dirigida por el desarrollo tanto en *C. elegans* como en *D. melanogaster*. Su acción radica en alargar la cola de poli A de RNAm que se encuentran “silenciados” y permitir así su entrada al proceso de

traducción. Al momento se desconoce el papel que esta enzima tiene en *T. brucei* (Keller, 2002).

**1.3.2.3 Estabilidad del RNAm:** Este es el evento mas estudiado en la regulación de la expresión génica en tripanosomátidos. Se han encontrado genes cuya proteína solo se expresa en uno de los estadios del ciclo de vida, aunque el RNA se transcriba en todos ellos (Teixeira, 1998, D'Orso y Frasch, 2001 a, Boucher *et al.*, 2002, Brown *et al.*, 2001, Chaudhuri *et al.*, 2002). Se han descrito elementos *en cis* de los RNAm mayoritariamente presentes en la región 3' UTR, aunque también los hay en el 5' UTR y en las regiones codificadoras (D'Orso *et al.*, 2003). Existe un tallo-asa de 16 nt en el 3' UTR del RNAm de prociclina en *T. brucei*, junto a este elemento también se encuentra un tracto de 26 pirimidinas. Estos dos elementos promueven la estabilidad y la traducción respectivamente (Hotz *et al.*, 1998; Furger *et al.*, 1997). Por otro lado, la región 3' UTR del RNAm que codifica a la glicoproteína de 85 kDa (que solo se expresa en tripomastigotes de *T. cruzi*) es capaz de conferir estabilidad a un gen reportero en ese estadio del ciclo de vida (Nozaki y Cross, 1995). Los elementos *en trans* que participan en la regulación de un RNAm deben tener motivos de reconocimiento a RNAs (RRM), estos motivos suelen ser muy conservados a lo largo de los eucariontes y son firmas clásicas de reguladores de splicing, así como de reguladores del desarrollo (Kim y Baker, 1993). En *T. cruzi* se ha identificado toda una familia de proteínas que presenta tales firmas, sus integrantes mejor caracterizados son TcUBP1 y TcUBP2 (D'Orso y Frasch, 2001 b). Estas dos proteínas tienen afinidad por secuencias de RNA ricas en U y se encargan de modular la estabilidad del RNAm de la proteína SMUG de forma estadio



específico. Adicionalmente se han identificado y clonado los genes para cuatro proteínas más similares a TcUBP1 y 2, por lo que se cree que se trata de una familia génica que regula la expresión de forma estadio-específica a juzgar por sus blancos (De Gaudenzi *et al.*, 2003). La identificación de estas proteínas permitió el descubrimiento de un elemento en *cis* novedoso no descrito para ningún otro organismo, los GRES, que son secuencias ricas en guanina. Finalmente en estos organismos aparentemente hay gran diversidad de secuencias reguladoras, ya que en *L. major* se ha descrito una secuencia de 450 nt localizada en el 3' UTR de un gran número de genes, todos ellos solo se expresan en el estadio amastigote por lo que presumiblemente existe un mecanismo común para su desestabilización en otros estadios (Boucher *et al.*, 2002). Esto es solamente una breve lista de los genes que son regulados a través de la estabilidad de su RNAm, en estos ejemplos se trata de genes de expresión estadio específica.

**1.3.2.4 Maquinaria de degradación:** En tripanosomátidos parece encontrarse una maquinaria de degradación con una complejidad similar a la descrita para mamíferos o levaduras, aunque estrictamente no se han encontrado todos los elementos. Se ha identificado un exosoma en *T. brucei*, pero solo se compone de 8 subunidades (Estévez *et al.*, 2001). Los genes que codifican para esas mismas subunidades también se encuentran en el genoma de *Leishmania* y *T. cruzi*. Por otro lado, también se han encontrado y caracterizado homólogos de *Xrn 1b* en *T. brucei*, ésta es la principal exoribonucleasa 5'-3' en mamíferos (Li *et al.*, 2006). Los primeros experimentos hechos para caracterizar la actividad de esta exonucleasa sugieren que tiene preferencia por RNAm que codifican productos de expresión estadio

específica (Li *et al.*, 2006). En *T. brucei* también se han reportado dos diferentes actividades de de-adenilasa, una de ellas es inhibida por la presencia de PABP pero independiente del CAP en 5', mientras que la otra actividad depende de la presencia de estos dos elementos (Milone *et al.*, 2004).

## **1.4 JUSTIFICACION Y ANTECEDENTES DIRECTOS**

### **1.4.1 Por qué estudiar genes ribosomales?**

En nuestro laboratorio existe un interés sobre el análisis molecular de genes codificadores de diferentes componentes del ribosoma de *T. cruzi*. El ribosoma es una estructura única en su tipo en el sentido de que incorpora productos de las tres diferentes RNA polimerasas de eucariontes: en primer lugar la unidad transcripcional principal de RNAr es transcrita por la RNA polimerasa I, en segundo lugar el RNAr 5S es generado por la RNA polimerasa III y finalmente los RNAm de las proteínas ribosomales que son transcritos por la RNA polimerasa II.

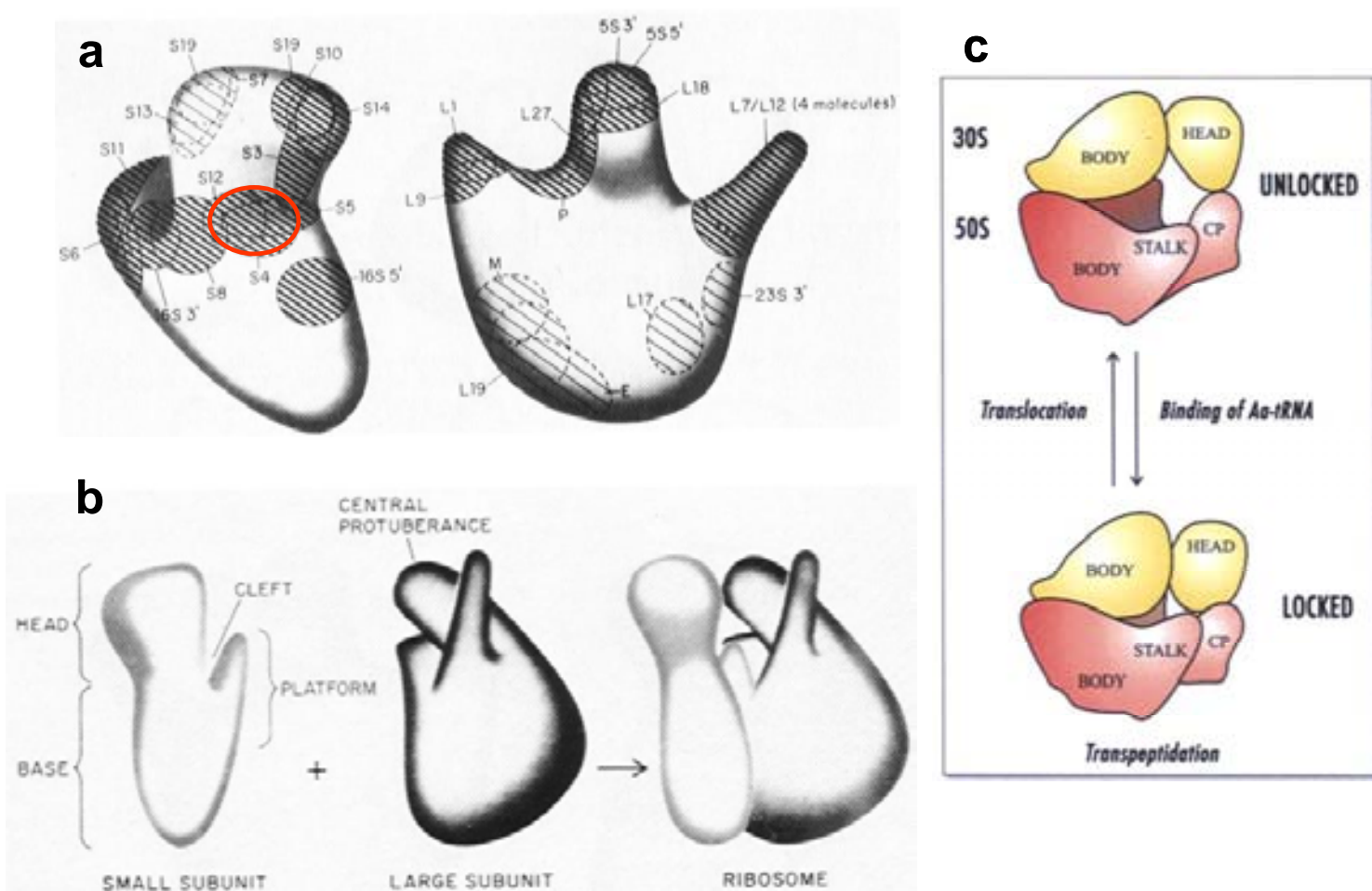
El mayor esfuerzo se ha enfocado en estudiar la síntesis de RNAr transcrito por la RNA polimerasa I. Se describió la organización génica de los componentes de la unidad transcripcional mayor de RNAr (Hernández *et al.*, 1988), de igual forma se definió el promotor que gobierna la transcripción de la misma (Martínez-Calvillo y Hernández 1994; Figueroa-Angulo *et al.*, 2006). Nuestro grupo también describió la organización génica del RNA 5S. Los esfuerzos iniciales del presente trabajo se dirigieron a la exploración y caracterización de elementos ribosomales transcritos por la RNA polimerasa II (i.e., proteínas ribosomales) (Hernández *et al.*, 1998).

### **1.4.2 La proteína ribosomal S4**

En las dos subunidades que conforman al ribosoma eucarionte se encuentran alrededor de 33 proteínas, éstas constituyen el andamio sobre el cual se pliega

el RNAr, además de que le dan forma a los diferentes sitios funcionales (A, P y E).

Las proteínas ribosomales (pr) se clasifican de acuerdo a dos criterios: el primero es la subunidad ribosomal a la cual se incorporan, mayor (L) o menor (S), según sea el caso; el segundo criterio de clasificación es dado por su patrón electroforético en un gel de dos dimensiones, lo que determina si por su carga son ácidas o básicas. Algunas proteínas ribosomales sobresalen en importancia porque se ha probado que son esenciales en algunos sistemas biológicos, o por realizar funciones clave en el proceso de traducción, éste es el caso de S4. Esta proteína de subunidad pequeña forma parte de la intersección de las dos subunidades (Uchiumi *et al.*, 1986) (fig. 11). Se ha probado que S4 es esencial en levadura (Synetos *et al.*, 1992) y es considerada entre las más importantes por su participación en la selección del RNAt entrante. Para que ocurra el proceso de transpeptidación, es decir cuando se genera la adición de un aminoácido a la cadena peptídica naciente, es necesario que el sitio A, donde debe entrar un RNAt, se encuentre abierto. Una vez que el RNAt se introduce, el sitio A se cierra por el acercamiento de los dominios vecinos (fig. 11). En este acercamiento participan activamente y en sinergia las proteínas ribosomales S4 y S12. De esta forma el RNAt queda asegurado dentro del sitio A y en la cercanía apropiada con el RNAm y con el péptido naciente para que se pueda realizar el siguiente enlace peptídico (Spirin, 2004). Adicionalmente se sabe que esta proteína se asocia con el factor de iniciación eIF3, por lo que se cree que S4 tiene un papel en la iniciación de la traducción (Westermann y Nygar, 1983).



**Figura 11: Localización de la proteína ribosomal S4 en el ribosoma y su participación en el proceso de traducción.** a) El círculo indica la localización aproximada de S4 en la subunidad pequeña ribosomal. b) Relación espacial que se establece entre las subunidades ribosomales mayor y menor; puede verse el punto aproximado donde se tocan y forman el sitio donde entra el RNAt. c) Acercamiento que ocurre entre el cuerpo y la cabeza de la subunidad menor (en amarillo) con la protuberancia central (cp) y el tallo de la subunidad mayor (en rojo). Antes de que el RNAt entre al ribosoma estos elementos se encuentran alejados, cuando el RNAt entra, se acercan, esto es facilitado por las proteínas S4 y S12. Cuando el acercamiento ocurre el RNAt quede atrapado y en cercanía suficiente con el RNAm y con la cadena peptídica naciente para que se pueda establecer el enlace peptídico. Cuando el RNAt es traslocado las estructuras vuelven a su estado relajado.

Debido a que nuestro interés es lograr la caracterización integral de S4 es necesario primero definir su arreglo genómico en un aislado que el laboratorio tiene y que corresponde a la cepa CL Brener. A continuación tenemos la intención de delinear el patrón de expresión de su transcrito, en principio en epimastigotes sin descartar por ello otros estadios del ciclo de vida. Ya que en *T. cruzi* la regulación de su expresión génica ocurre fundamentalmente por mecanismos post-transcripcionales se contempla por lo menos el estudio de la vida media de su RNAm para tener una idea de cómo se regula su expresión. Por lo anterior se proponen los siguientes objetivos.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Generar un panorama general sobre la expresión de productos ribosomales transcritos por RNA polimerasa II.

### **2.2 Objetivos particulares**

2.2.1. Determinar la organización genómica de S4 en *T. cruzi* cepa CL Brenner

2.2.2. Determinar los niveles de RNAm de S4 en epimastigotes de *T. cruzi*.

2.2.3. Determinar la vida media del RNAm de S4 en epimastigotes de *T. cruzi*.

## **3 RESULTADOS**

### **3.1. Arreglo genómico de S4 en *T. cruzi***

#### **3.1.1 Clonación y análisis de la secuencia del locus de la proteína ribosomal S4 en *T. cruzi***

Este proyecto inició antes de la liberación de la secuencia del genoma de *T. cruzi*, por lo que el primer paso fue determinar el arreglo génico de S4 en este organismo. Se realizó una búsqueda dentro de una biblioteca genómica empleando una sonda homóloga obtenida de un cDNA de S4 previamente caracterizado en el laboratorio (Hernández R. *et al.*, 1998). Se aislaron dos clonas genómicas correspondientes a dos alelos homólogos. Por medio del análisis de patrones de restricción y de ensayos tipo Southern se logró delimitar el área reconocida por la sonda de S4 a fragmentos de restricción flanqueados por sitios para las enzimas *Not* I y *Eco*R I. Los dos fragmentos difieren entre sí por ~1 Kb, ya que una de las clonas mide 3.4 Kb y la otra 2.4 Kb (fig. 12 a). Ambos fragmentos fueron secuenciados. Las secuencias se depositaron en el Gene Bank con los siguientes números de acceso DQ288964 y DQ288965. Al analizar las secuencias se encontró que la diferencia de 1 Kb entre las dos clonas se debía a una segunda copia de S4 presente en uno de los alelos. La clona de 3.4 Kb se denominó alelo 1, y la clona de 2.4 Kb, alelo 2.

Las copias de S4 encontradas en el alelo 1 se nombraron S4-1 y S4-2, mientras que a la única copia presente en el alelo 2 se le llamó S4-3 (fig. 12 a). Las copias S4-1 y S4-2 se encuentran arregladas en tandem y están separadas entre sí por una región intergénica de 251 nt. Los tres marcos de lectura abiertos de S4 son idénticos entre

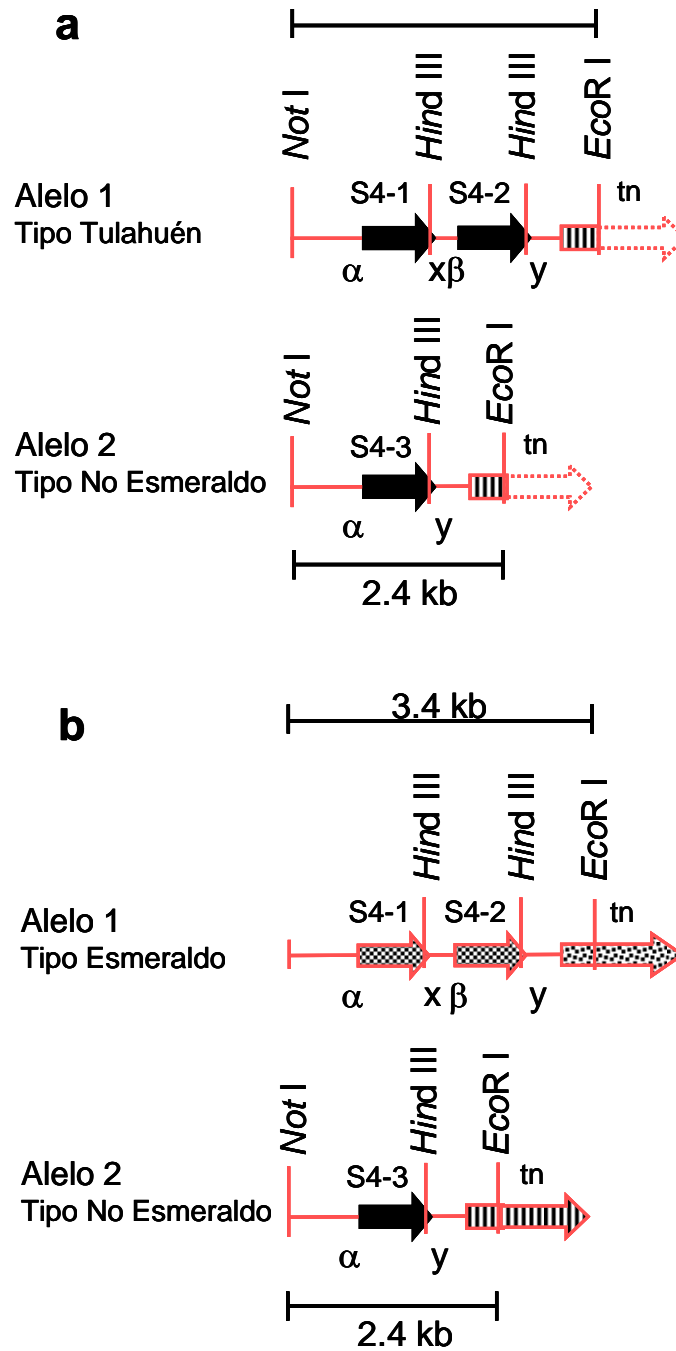
sí y con un cDNA previamente caracterizado y reportado proveniente de la cepa Tulahuén (Hernández *et al.*, 1998). Hacia el extremo 3' de las clonas secuenciadas se identificaron 275 pb de un marco de lectura abierto. Después de buscarlo en la base de datos de NCBI con el programa Blast ([www.ncbi.gov](http://www.ncbi.gov)) se encontró que esta secuencia corresponde a un transportador de nucleósidos. En las dos clonas estos 275 pb son idénticos. Los dos fragmentos terminan en un sitio para la enzima de restricción *Eco* R1 (fig. 12 a).

La cepa CL-Brener, elegida para el proyecto del genoma de *T. cruzi*, es una cepa híbrida (El Sayed N. *et al.*, 2005). Frecuentemente los alelos de esta cepa se denominan “tipo Esmeraldo” o “tipo no-Esmeraldo”. Esta notación deriva del linaje del cual proviene el alelo en cuestión. Al buscar las secuencias correspondientes a *S4* en la base de datos del proyecto del genoma de *T. cruzi* (<http://www.genedb.org/genedb/tcruzi/blast.jsp>), se encontraron dos contigs que incluían genes de *S4* (fig. 12 b). Inmediatamente identificamos por la identidad de las secuencias, que uno de ellos correspondía al alelo 2 encontrado por nosotros. En el genoma este alelo está tipificado como “no esmeraldo” (fig. 12 b).

Sin embargo el alelo 1 no fue encontrado en la anotación del genoma. En su lugar se halla un alelo tipificado como “Esmeraldo”. Éste contiene dos copias en tandem de *S4* pero guarda algunas diferencias con el alelo 1: primero la región codificadora de *S4* difiere en ocho cambios conservados; no se encuentra el sitio para la enzima de restricción *Not* I; además aunque el alelo “tipo Esmeraldo” contiene un transportador de nucleósidos río abajo de las copias de *S4*, su secuencia tiene 18



cambios de nucleótido que se traducen en cinco cambios de aminoácidos al compararlo con las secuencia encontradas por nosotros (fig. 12 b).



**Figura 12: Mapa genómico del locus de la proteína ribosomal S4 en *Trypanosoma cruzi*:** **a)** Alelos de la proteína ribosomal S4 encontrados y secuenciados, acotados por los sitios para las enzimas de restricción *Not* I y *Eco* RI. El alelo variante fue nombrado “tipo Tulahuén”. Este alelo reemplaza al “tipo Esmeraldo” encontrado en la secuencia del genoma. En flechas sólidas negras están las copias de S4 (S4-1, S4-2 y S4-3). La flecha del transportador de nucleósidos (tn) está en línea punteada por que la secuencia se detuvo en el sitio de *Eco* RI. **b)** Alelos de la proteína ribosomal S4 encontrados en la base de datos del genoma de *T. cruzi*. Las flechas indican los marcos de lectura abiertos encontrados. Las diferencias en el patrón de las flechas con respecto al panel a, reflejan las diferencias encontradas en las secuencias analizadas. Regiones 5' UTR de las copias de S4 señaladas como  $\alpha$ ,  $\beta$ ; Regiones 3' UTR señaladas como X, Y.

Cuando se analizaron las regiones adyacentes de la copia S4-2 (ver adelante) se encontró que son idénticas a las regiones no traducidas presentes en el cDNA de la cepa Tulahuén previamente caracterizado (Hernández *et al.*, 1998), se decidió nombrar a este alelo 1 como tipo “Tulahuén” (fig. 12 a).

### **3.1.2 Caracterización de los sitios de procesamiento de los RNAm de la proteína ribosomal S4**

En la maduración de un RNAm ocurren dos reacciones acopladas el trans splicing y la poliadenilación, estas modificaciones hacen posible su traducción (Vasella E. *et al.*, 1994). Estas dos modificaciones ocurren dentro de las regiones intergénicas del transcrito primario policistrónico y son dirigidas por una región rica en pirimidinas (Huang y Van der Ploeg, 1991).

Al analizar las regiones adyacentes a las tres copias de S4 notamos que la secuencia río arriba de las copias S4-1 y S4-3 son idénticas ( $\alpha$  en la fig. 12 a), lo mismo ocurre con las secuencias río abajo de las copias S4-2 y S4-3 ( $\beta$  en la fig. 12 a). Finalmente la secuencia contenida entre las copias S4-1 y S4-2 (indicado como  $x$  y  $y$  en la fig. 12 a) es única. Estas diferencias ocasionan que por efecto de los procesos de *trans*-splicing y poliadenilación, se generen tres RNAm diferentes entre sí, a pesar de que las tres regiones codificadoras de S4 sean iguales. Las diferencias están en las regiones no traducidas en 5' y 3'. Estas diferencias nos permitieron identificar que el cDNA de la cepa Tulahuén previamente caracterizado proviene de la copia 2 (figs.12 y 13).

Para identificar los sitios donde un RNAm es procesado basta con alinear la secuencia genómica de un gen particular, con secuencias obtenidas del cDNA correspondiente. La única condición es que en el cDNA se vea por lo menos el principio de la cola de poli A y al menos los últimos nucleótidos del SL. Para encontrar los sitios de procesamiento de los RNAm de S4 primero se buscaron secuencias de cDNA en las bases de datos de NCBI y EMBL. Se encontraron un total de 32 secuencias, 21 de ellas provenientes de epimastigotes, 6 de amastigotes y 5 de tripomastigotes. Los sitios de procesamiento identificados se muestran en la figura 13.

S4-1 CTATCGCCTTTTTTTTTCCCATTCACCCCTTTGCATCTACCCGTACTCTTGTACATACGTG  
S4-2 ..TCTTTT.....TTTGGG.TTGTT..ACGT.TACTTTTCTT.A.CTG.TAGTGAGT  
S4-3 .....

S4-1 TAAAAGGAACCTAAAACATG S4 coding region TAGGTTTGTTCTTTGCTGGC  
S4-2 .GC.GCTCTTTGTC.TTATG S4 coding region TAG..GCAGAGCAACT.T.T  
S4-3 ....AG.....ATG S4 coding region TAG..GCAGAGCAACT.T.T

S4-1 GATGGGTGATGCTAATGGTTCGGTTCTTTTTTGATCCTCTTTTGTTTCATTTCCATTAA  
S4-2 TT.TAA.TT.AT.TTGAT.ATTT..CT.....CATTCG.GAAC..TTC.GTGCA.GTT  
S4-3 TT.TAA.TT.AT.TTGAT.ATTT..CT.....CATTCG.GAAC..TTC.GTGCA.GTT

S4-1 AAATAGAATTTTTTTCTTGCTTCTATCTTGCCGTTAGCGTGGTAGCGGGAACCCTTATTA  
S4-2 TTCA...TGC.CC.CT.CTTGA.GG.T.GTA...CC.T..C.CC...CAC..AA.G.AGT  
S4-3 TTCA...TGC.CC.CT.CTTGA.GG.T.GTA...CC.T..C.CC...CAC..AA.G.AGT

**Figura 13: Sitios de procesamiento de los RNAm de S4 en *Trypanosoma cruzi*.**

Alineamiento de las secuencias genómica de las 3 copias de S4 encontradas. Los puntos indican identidad de nucleótido. En azul se enmarcan regiones ricas en pirimidinas que controlan el trans splicing. Los dinucleótidos AG, en rojo, son los sitios donde se une el spliced leader. Las regiones codificadoras de S4 están solo abreviadas, en negritas se indican los codones de inicio y paro de la traducción. En verde se señalan los sitios de poliadenilación encontrados.

Para deducir los sitios de procesamiento de S4-2 se usaron las secuencias de cDNA con número AF005421 y AF005904 depositadas en genebank. Para determinar los correspondientes a S4-1 y S4-3 se emplearon las secuencias de cDNA con número de acceso AA426688 y CB923834.

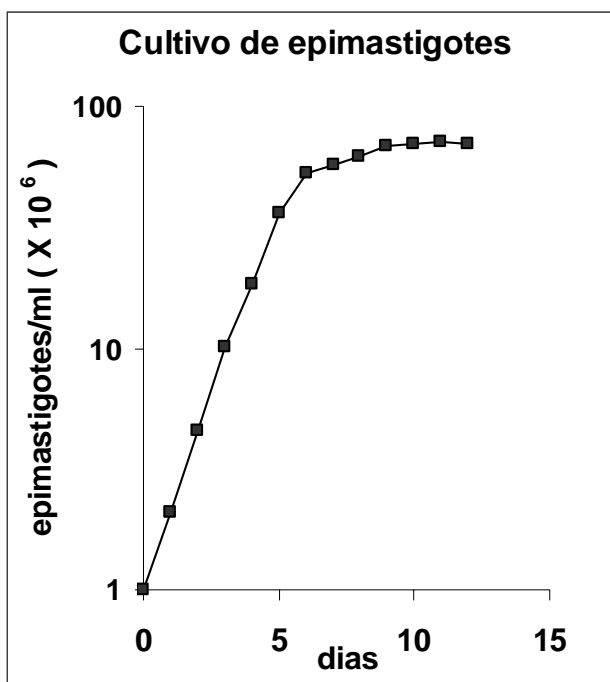
El objetivo a continuación fue determinar el patrón de expresión del transcrito de S4 a lo largo de la curva de crecimiento de epimastigotes. Los resultados obtenidos en principio no mostraban un patrón definido por lo que se optó primero por establecer una forma de cultivo que permitiera resultados reproducibles.

## **3.2 Determinación de la expresión del RNAm de S4 en epimastigotes de *T. cruzi***

### **3.2.1 Establecimiento del sistema experimental**

Los epimastigotes de *T. cruzi* constituyen el estadio que en condiciones naturales crece en el intestino del vector reduviedo. Esta forma se cultiva fácilmente en el laboratorio en medio LIT a 28°C. Los cultivos constituyen esencialmente una población de células en diferentes puntos del ciclo celular. Con el fin de homogenizar los cultivos para su análisis experimental, las células fueron sembradas serialmente (3 veces) de una densidad de  $1 \times 10^6$  hasta llegar a  $30 \times 10^6$  células/ml. Los parásitos que se usaron en todos los experimentos partieron de estas condiciones. Estos cultivos celulares inician a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml. Desde este punto y hasta que llegan a la fase estacionaria transcurren alrededor de 15 días (fig. 14), la densidad celular es de  $\sim 90 \times 10^6$  células/ml.

Los experimentos que más adelante se describen como realizados en la mitad de la fase logarítmica (ML), se llevaron a cabo cuando los cultivos alcanzaron densidades de  $8-10 \times 10^6$  parásitos /ml, mientras que los experimentos de fase estacionaria se hicieron 72 h después de que cesó el crecimiento del cultivo, aquí el cultivo tiene  $\sim 85$  a  $90 \times 10^6$  parásitos/ml.



**Figura 14: Curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*.**

La gráfica se realiza haciendo cuentas diarias del cultivo de epimastigotes. La curva de crecimiento tiene una duración de 15 días. Densidad del cultivo expresada en células por ml de medio.

### 3.2.2 Determinación de los niveles de RNAm de *S4* en un cultivo de epimastigotes

El siguiente paso fue analizar la expresión del RNAm de la proteína ribosomal *S4*.

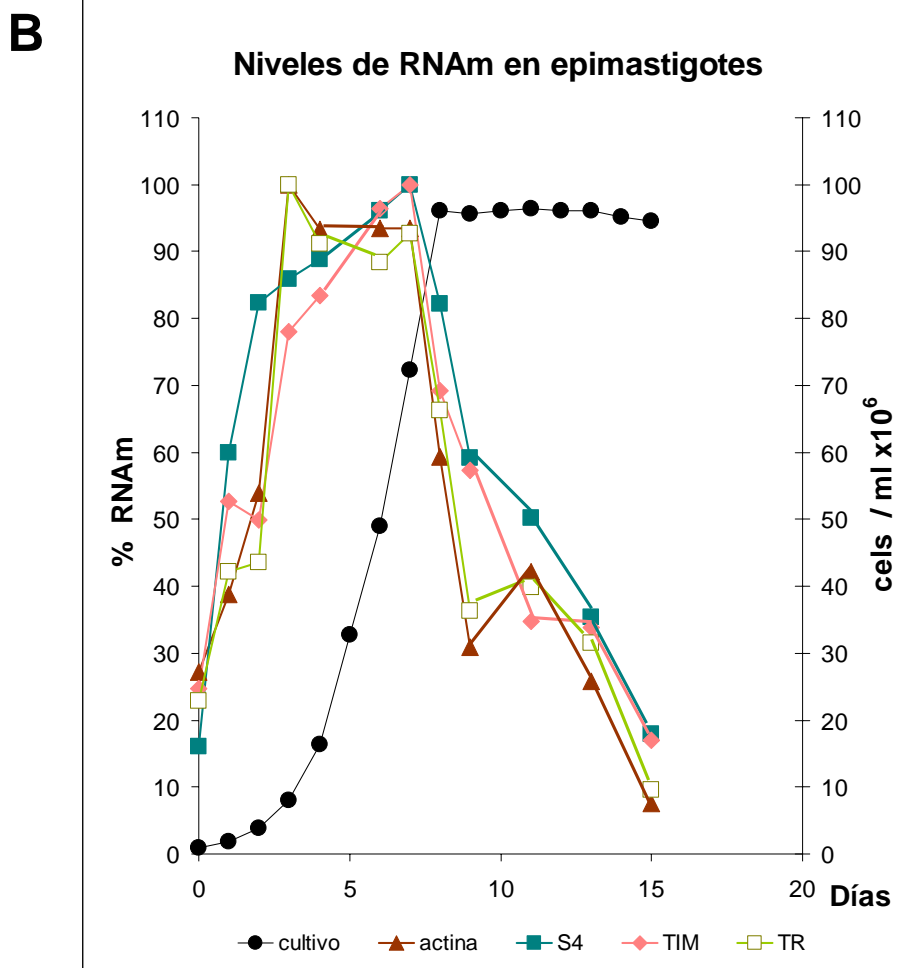
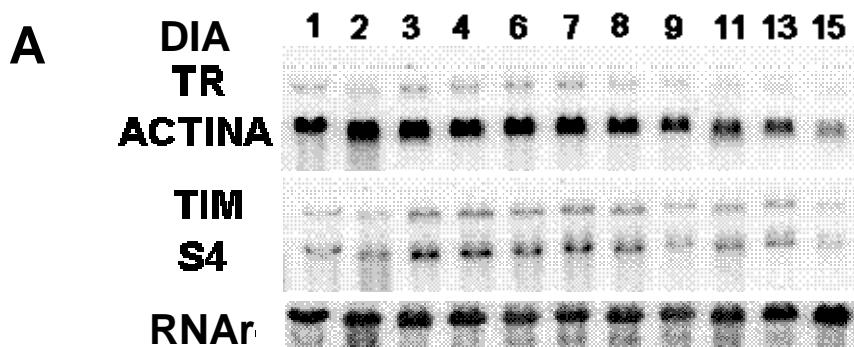
Se tomaron muestras de RNA de cada día de la curva para monitorear el nivel de RNAm. La cantidad relativa de este mensajero se encuentra aumentada en la fase logarítmica, donde se observó un pico, mientras que hacia la fase estacionaria el nivel de RNAm cae hasta un 15 a 20% de su expresión máxima (fig. 15 ■).

Para determinar si el comportamiento del RNAm de *S4* era particular de mensajeros de proteínas ribosomales o común a otros mensajeros de proteínas de mantenimiento (housekeeping), se eligieron varios genes con el fin de tener variedad funcional. Los genes cuyos transcritos se añadieron al estudio fueron actina, triosa

fosfato isomerasa (TIM) y tripanotión reductasa (TR). El principal criterio para su elección fue que los tres son considerados como genes de mantenimiento ya que desempeñan importantes funciones dentro del metabolismo celular. Adicionalmente TIM y TR son considerados como potenciales blancos con valor terapéutico (Fairlamb, 1990); por otro lado actina es bien conocida como una proteína típicamente de citoesqueleto y aunque es una proteína bien representada en el genoma de este organismo poco se sabe de su papel en esta especie (Cevallos *et al.*, 2002).

Los transcritos de los tres genes agregados describen el mismo patrón de fluctuación que el de *S4* (fig. 15). De este resultado se deduce que este comportamiento similar en la concentración de transcritos de genes que codifican para proteínas con funciones diferentes se deba a un mecanismo común, al menos entre mensajeros de mantenimiento.

Es de nuestro interés investigar mecanismos post-transcripcionales potencialmente involucrados en modular la concentración de RNAm en fase estacionaria de cultivos de *T. cruzi* (epimastigotes).



**Figura 15: Niveles de RNAm de genes de mantenimiento en una curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*.** a) Muestras de RNA total tomadas a lo largo de un cultivo de epimastigotes fueron inmobilizadas en ensayos tipo northern, luego hibridadas con sondas específicas (10 µg/línea). b) Los niveles de los RNAm analizados (actina ▲; S4 ■; TIM ◆ y TR □) se graficaron con respecto al tiempo del cultivo. Los valores se expresan como porcentaje. En • se observa el crecimiento del cultivo de epimastigotes.

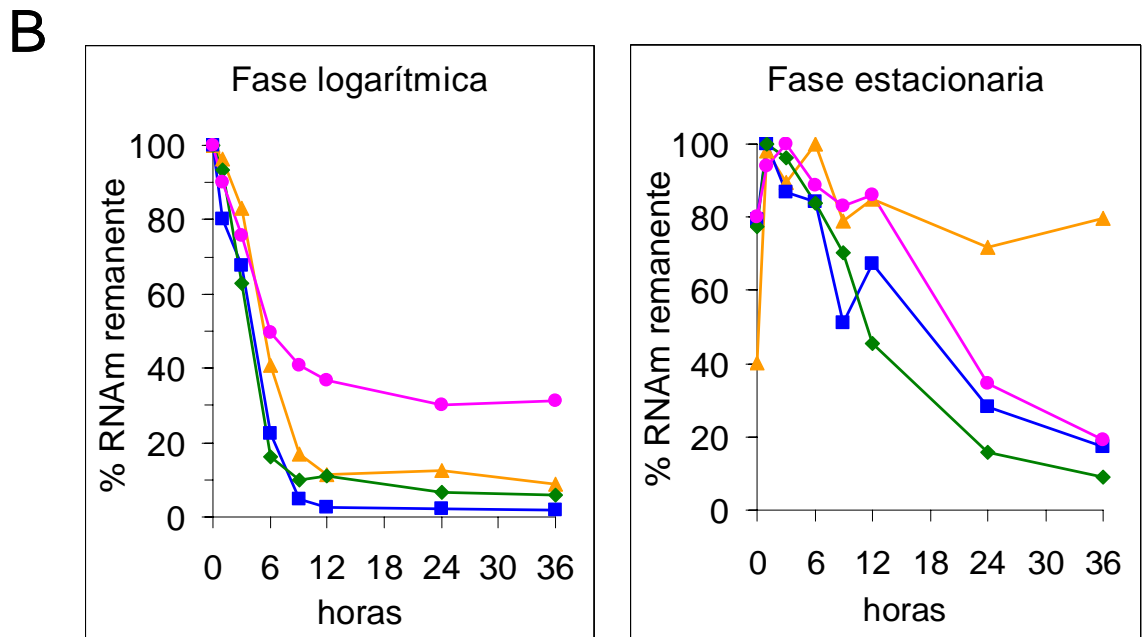
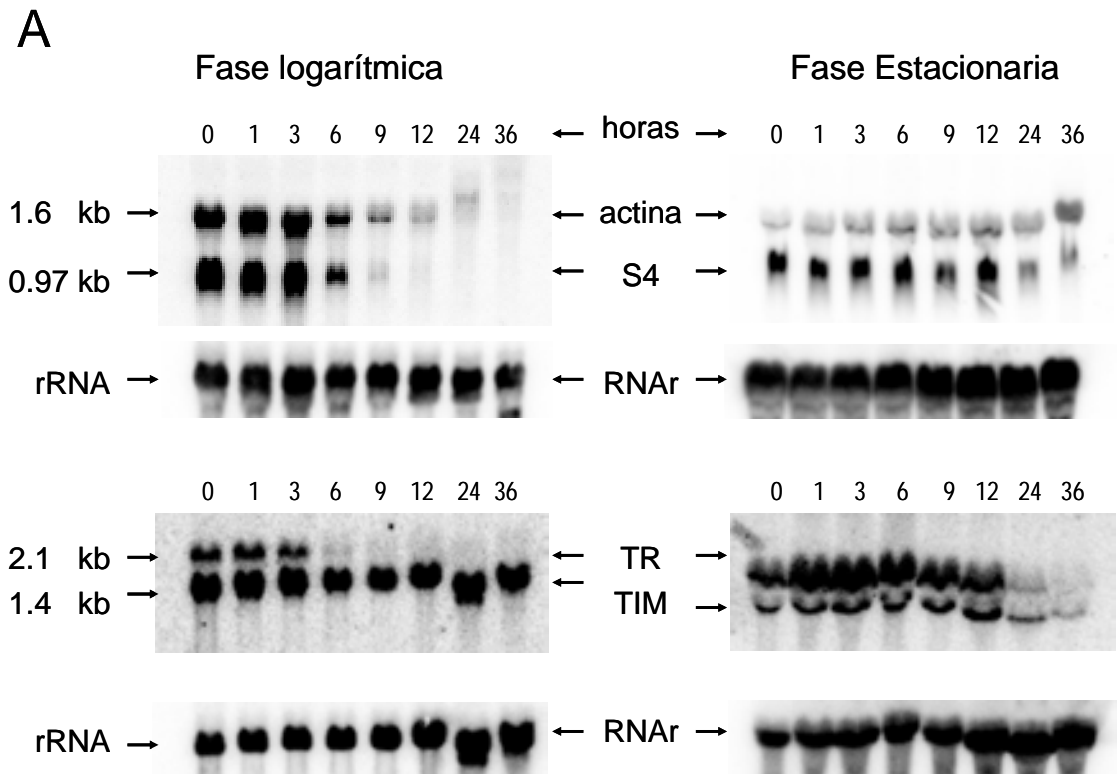


### 3.2.3 Vida media de RNAm

La determinación de la vida media de los RNAm en estudio se hizo tanto en la fase logarítmica como en la fase estacionaria. Para ello se interrumpió la transcripción usando actinomicina D (10  $\mu\text{g/ml}$ ), después se tomaron muestras de RNA total a diferentes tiempos. Las muestras se analizaron en ensayos tipo northern, donde se siguió la disminución de la intensidad de la banda de cada RNAm de interés desde el tiempo 0 hasta su desaparición. Se emplearon sondas específicas para cada RNAm. La vida media se define como el tiempo en que un RNAm disminuye su concentración hasta el 50% de su valor máximo (fig. 17).

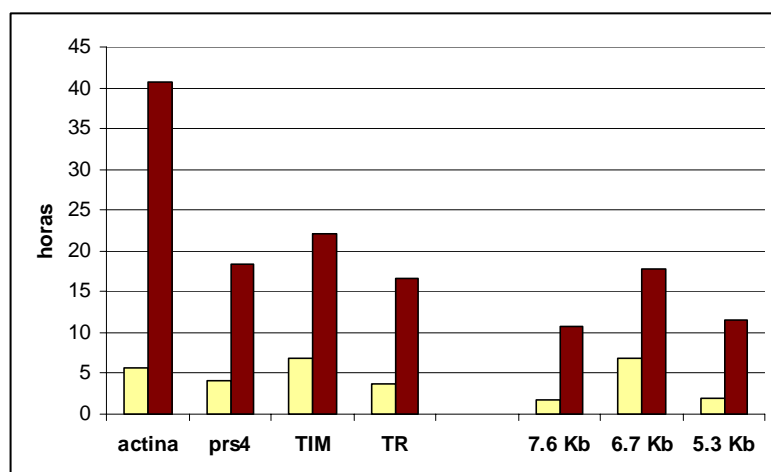
En la figura 16a, se muestra las señales obtenidas de las hibridaciones para *S4*, actina, TIM y TR, en las fases logarítmica y estacionaria. Como referencia de carga se usó el RNAr 18S. Los valores obtenidos se expresaron en porcentaje, donde el 100% es el punto donde la señal fue mayor.

Los cuatro RNAm analizados son más estables en fase estacionaria que en fase logarítmica. En promedio el valor de la vida media de cada transcrito es casi cinco veces mayor en fase estacionaria que su respectivo en fase logarítmica (fig. 17).



**Figura 16 Vida media de RNAm de epimastigotes en las fases logarítmica y estacionaria.** a) Hibridaciones obtenidas con sondas específicas para S4, actina, TIM y TR a diferentes tiempos después de la adición de actinomicina D (10  $\mu\text{g/ml}$ ). b) Cuantificación del decaimiento de los RNAm analizados S4 (■), actina (▲), TIM (•) y TR (◆). Valores expresados en porcentaje usando el punto de mayor intensidad de la señal como el 100%. La señal del RNA ribosomal se empleó como control de carga.

Como una observación adicional, se encontró que las moléculas precursoras de RNAr, son también más estables en fase logarítmica que en fase estacionaria (Cevallos *et al.*, 2005). Estos precursores corresponden a especies moleculares con tamaños estimados de 7.6, 6.7 y 5.3 Kb.



	ML	S
<b>RNAm</b>		
Actina	5.7	40.6
<i>prS4</i>	4.2	18.3
TIM	6.9	22.1
TR	3.8	16.6
<b>Precursores RNAr</b>		
7.6 Kb	1.7	10.8
6.7 Kb	6.8	17.9
5.3 Kb	2.0	11.6

**Figura 17: Valores de las vidas media de RNAm y precursores de RNAr en fase logarítmica y estacionaria.** Los valores fueron calculados usando únicamente el área lineal de las curvas de decaimiento de las moléculas de RNA en los ensayos con actinomicina D. En blanco se ven los valores de fase logarítmica (ML) y negro los de fase estacionaria (S). En la tabla los valores se expresan en horas.

### 3.3 Búsqueda de un mecanismo estabilizador de RNAm

#### 3.3.1 Búsqueda de elementos conservados en las secuencias de los RNAm de genes de mantenimiento

Debido a que en el fenómeno de estabilización de transcritos en fase estacionaria participan diferentes RNAm decidimos tratar de identificar factores estabilizadores

comunes a los cuatro tipos de RNAm. Primero se intentó encontrar en sus secuencias algún elemento común. Esta búsqueda se hizo alineando la secuencias de los RNAm completos, esto incluye la 5' UTR, la secuencia codificadora y la 3'UTR. Sin embargo esto no produjo la identificación de alguna secuencia conservada.

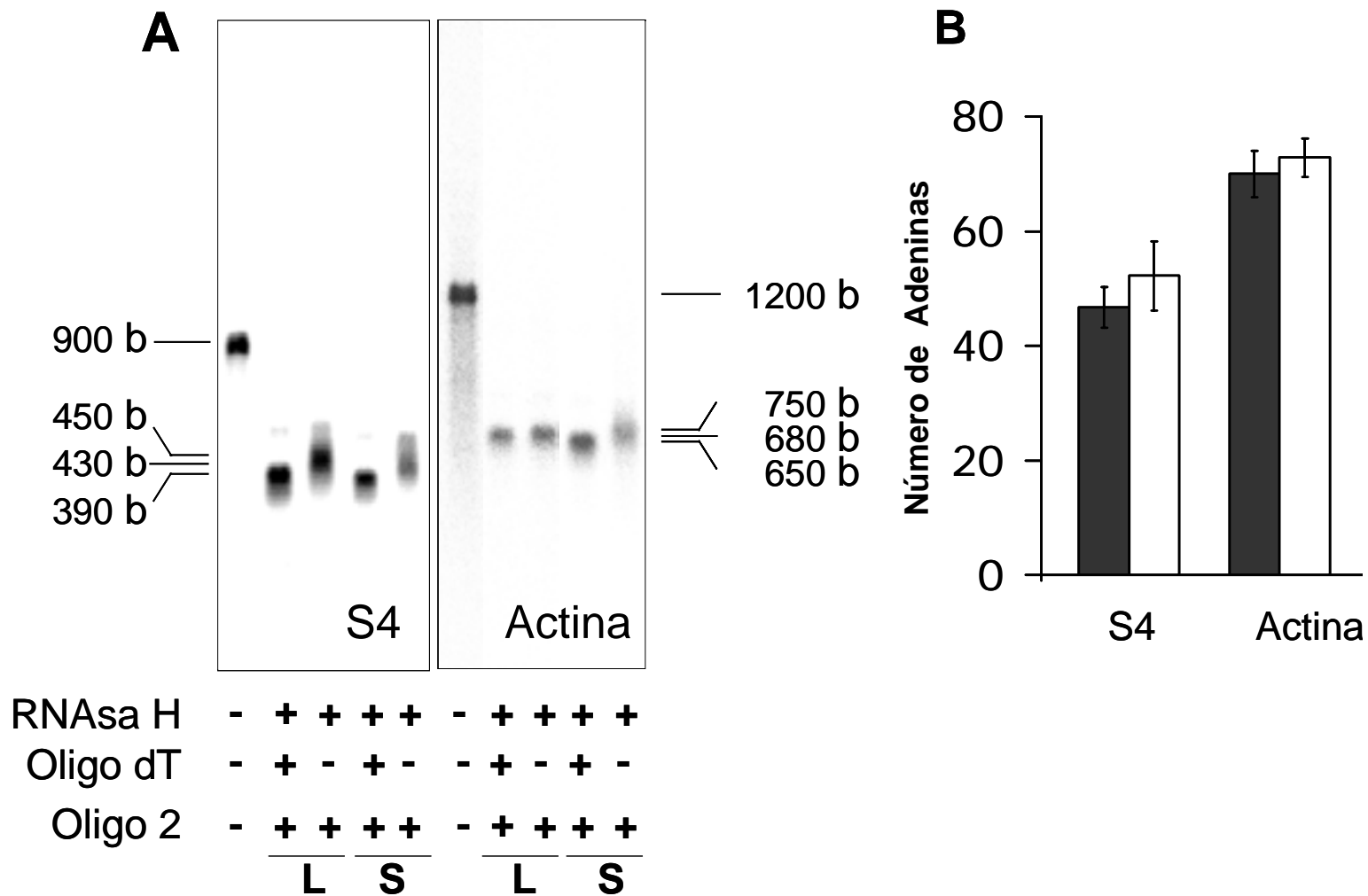
Los elementos reguladores de la estabilidad de un RNAm que se encuentran en *cis*, no son necesariamente secuencias conservadas, también pueden ser elementos constituidos por alguna estructura secundaria (ejemplo tallo asa). Por eso se simuló el “plegamiento” de los cuatro RNAm. Nuevamente no encontramos algún elemento o estructura que fuera común a las cuatro moléculas.

### **3.3.2 Participación de la cola de poli A**

En la estructura típica de un RNAm eucarionte hay dos elementos constantes: en el extremo 5' se encuentra la modificación 5 metil guanosina o “cap” mientras que en el extremo 3' se encuentra la cola de poli adeninas. Los dos elementos son considerados estabilizadores del RNAm, ya que para su apropiada degradación es necesaria la eliminación de ambos elementos (Garneau *et al.*, 2007). A todos los transcritos de *T. cruzi* se les adiciona el SL en 5' por la reacción de *trans* splicing y debido a que aquel es portador del “cap”, sabemos que todos los RNAm lo poseen (Matthews *et al.*, 1994). Además no se ha visto que la composición del “cap” cambie en alguna circunstancia, por lo que podemos deducir que esta estructura no se encuentra participando en el fenómeno de estabilidad diferencial de los RNAm.

En cuanto a la cola de poli A, ésta puede presentar cambios en al menos dos niveles: uno es el punto en donde se coloca, ya que éste puede variar ligeramente; y otro es su longitud (Sallés *et al.*, 1999). Estas variaciones pueden tener impacto en la estabilidad del RNAm. Por lo anterior nuestro siguiente objetivo fue medir la longitud de la cola de poli A en las fases logarítmica y estacionaria para compararlas. Se empleó el ensayo llamado oligo dT + RNAsa H. En este ensayo por cada RNAm a analizar se usan dos muestras de RNA total. De estas muestras una es incubada con oligo dT en las condiciones para que éste hibride con la cola de poli A. Después las muestras se digieren con RNAsa H, que específicamente corta RNA hibridado con DNA, los RNAm de la muestra incubada con oligo dT pierden de esta manera la cola de poli A. Las dos muestras se corren paralelas en un gel de agarosa, la diferencia en la distancia de electroforesis de las dos muestras se interpreta como el tamaño de la cola de poli A.

Para darle mayor resolución al ensayo se generan fragmentos más pequeños de RNA, introduciendo al ensayo un oligonucleótido secundario que hibrida en alguna región interna al RNAm en estudio, en este caso las dos muestras mencionadas atrás son incubadas con este oligonucleótido. Los resultados obtenidos para los mensajeros de actina y S4 se pueden ver en la figura 18.



**Figura 18** Tamaño de cola de poli A de los RNAm de actina y S4 en las fases logarítmica y estacionaria. **a)** En el extremo izquierdo de cada panel se aprecia una muestra de RNA sin tratar y demuestra el tamaño del RNAm completo. La diferencia en la migración de las muestras tratadas con y sin oligo dT se interpretó como el tamaño de la cola de poli A, en fase logarítmica (L) y estacionaria (S). Para analizar moléculas de menor tamaño los RNAs también fueron tratados con oligonucleótidos complementarios a la región codificadora (oligo 2). Los tamaños de las moléculas resultantes se estimaron a través del marcador de peso molecular 0.16-1.77 Kb RNA ladder de Invitrogen. **b)** Tamaño promedio del poli A estimado a partir de 5 experimentos independientes. Fase logarítmica en negro y fase estacionaria en blanco. Las líneas verticales señalan la desviación standard.

De acuerdo con los resultados anteriores, se calculó que los RNAm estudiados tienen colas de poli A cortas, de menos de 100 adeninas. Por otro lado las colas de poli A en fase estacionaria en promedio son ligeramente más largas que en fase logarítmica, pero esta diferencia no resultó estadísticamente suficiente para atribuirle la estabilización diferencial del RNAm.

### **3.3.3 Degradación diferencial de transcritos endógenos**

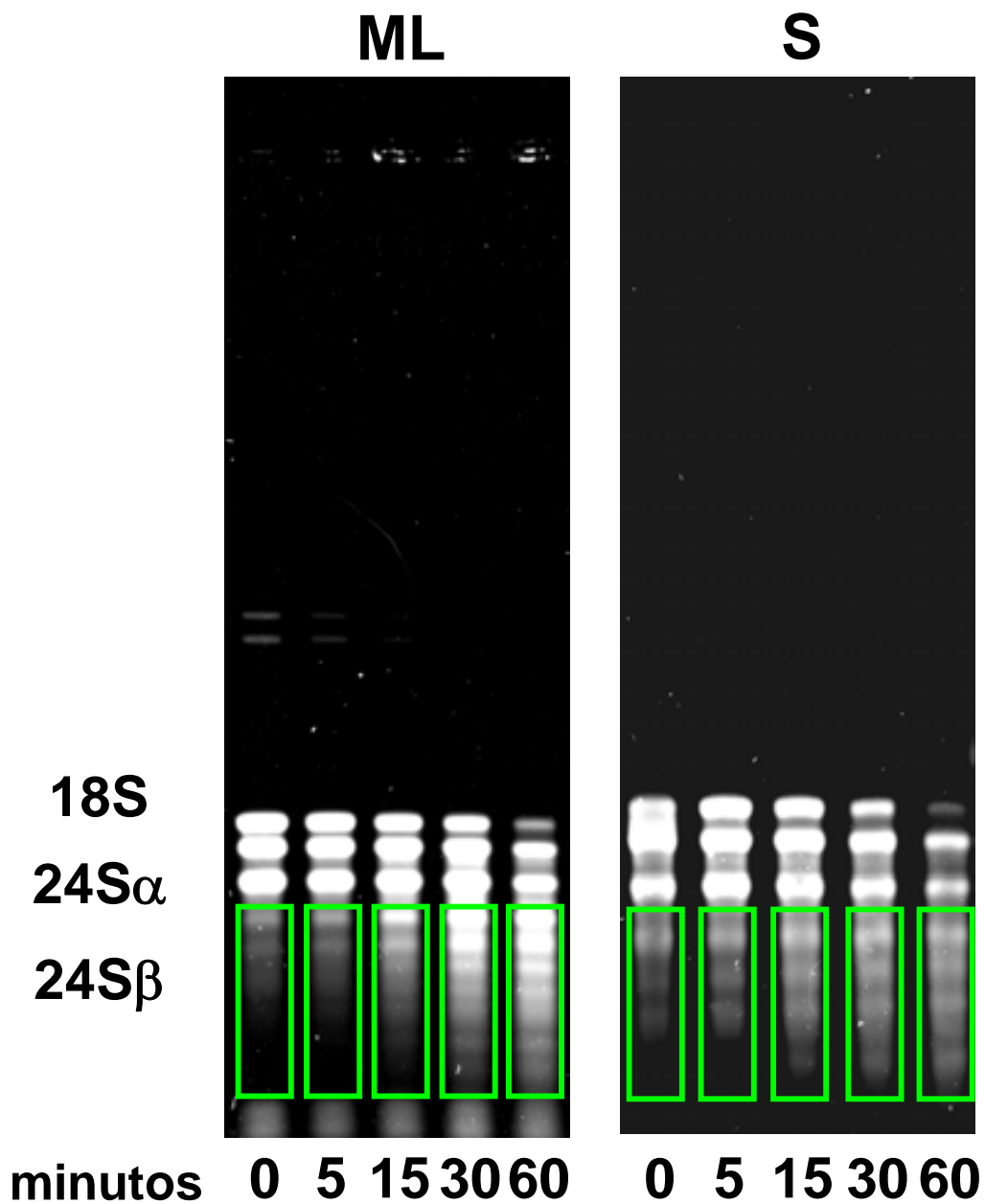
Al no haber encontrado ningún elemento estructural de los transcritos analizados que pudiera explicar su estabilización en fase estacionaria, decidimos analizar y comparar la capacidad degradativa general de las células de fase logarítmica y estacionaria.

Para medir la degradación de RNA en células de fase logarítmica y estacionaria se diseñó un ensayo muy simple. Brevemente, se obtuvieron extractos celulares a partir de una lisis limitada realizada con un detergente suave. Éstos fueron incubados a 28°C, que es la temperatura a la que crecen los parásitos. Los extractos fueron tratados a manera de conservar la población de RNA así como las proteínas en ellos. De acuerdo con el diseño, durante la incubación se permite que transcurra la degradación del RNA. A tiempos seriados se toman alícuotas del material en incubación y se depositan en Trizol, al hacer esto se detiene la degradación de la muestra.

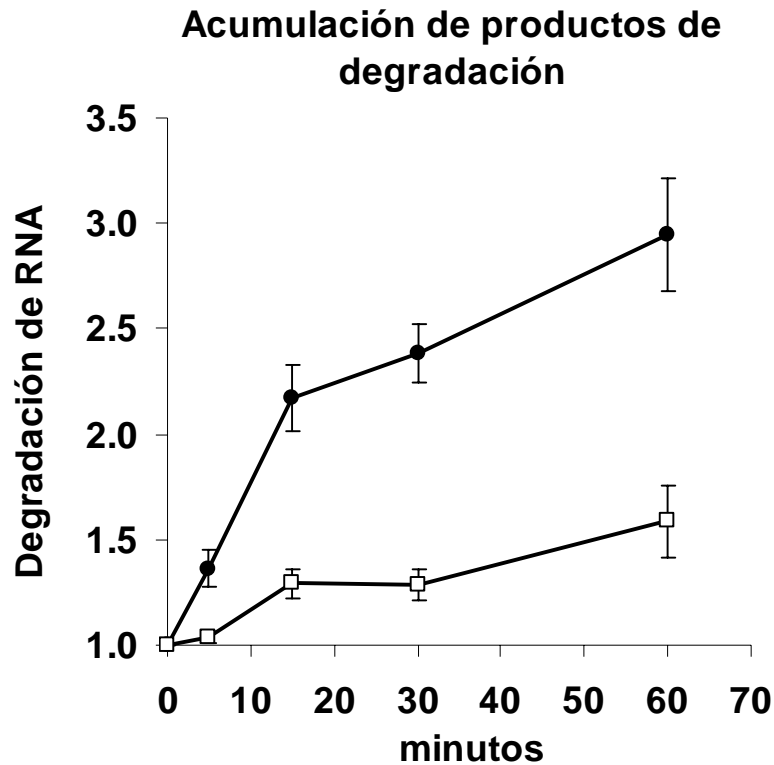
Las muestras obtenidas se observaron y analizaron en geles de agarosa 0.8% teñidos con bromuro de etidio (fig. 19). En la parte inferior del gel se observa que progresivamente se acumulan moléculas de bajo peso molecular. Estas se interpretaron como productos de degradación de RNA. Se hizo una densitometría del área ocupada por los productos de degradación. Al graficar la acumulación de los productos de degradación con respecto al tiempo se logra una cinética de la degradación del RNA endógeno en diferentes tiempos (fig. 20).

Estos resultados indican que en la fase logarítmica la acumulación de los productos de degradación ocurre a mayor velocidad (2.5 veces), que en la fase estacionaria (fig. 20).





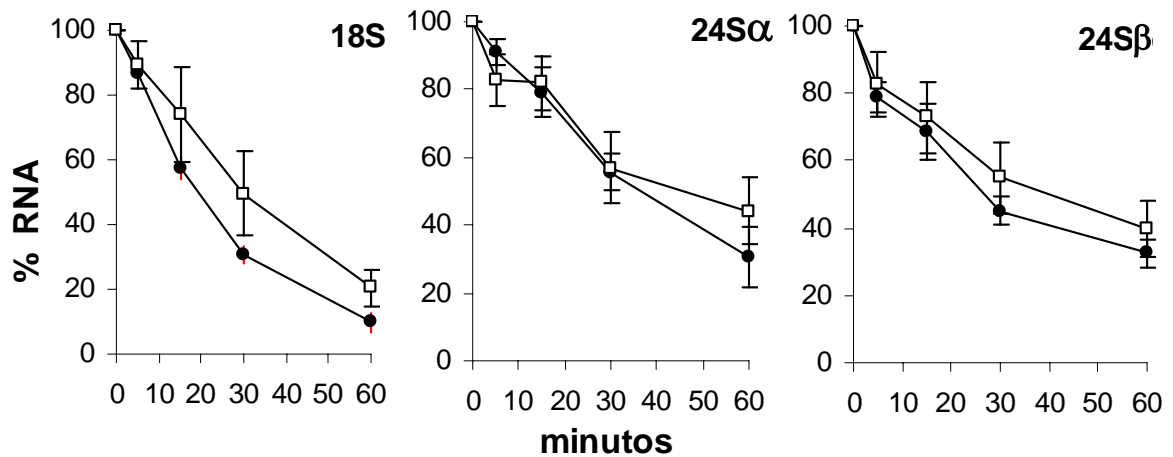
**Figura19: Ensayos de degradación de RNA en lisados celulares de epimastigotes de *T. cruzi*.** Las muestras obtenidas a diferentes tiempos después de lisar las células se analizaron en geles de agarosa 0.8% teñidos con bromuro de etidio. Previo a su observación en gel se determinó la concentración de RNA de las muestras para igualar la carga en cada carril a 10  $\mu$ g. Debido a su abundancia es posible las especies mayores de RNAr: 18S, 24S $\alpha$  y 24S $\beta$ . En cada carril se analizó por densitometría el área rectangular localizada por debajo de la molécula de RNAr 24S $\beta$ , para medir la acumulación relativa RNA de bajo peso molecular.



**Figura 20: Cinética de acumulación de productos de degradación de RNA.** La acumulación de RNA de bajo peso molecular encontrada en los ensayos de degradación fue graficada como el aumento con respecto al valor en el tiempo cero, el cual fue tomado como 1. Promedio de 5 experimentos independientes. Las líneas verticales indican la desviación standard. Fase logarítmica (●), fase estacionaria (□).

Ya que el RNAr es muy abundante, es posible verlo en las muestras de degradación cuando éstas se analizan en geles de agarosa. El RNAr de *T. cruzi*, está fragmentado (Hernández *et al.*, 1988), tiene tres especies mayores llamadas 18S, 24S $\alpha$  y 24S $\beta$ . Por esto analizamos la degradación de estas tres moléculas de RNAr individualmente. Se hizo la densitometría de los RNAr y se graficó la disminución de la intensidad de cada banda con respecto al tiempo (fig. 21): las especies

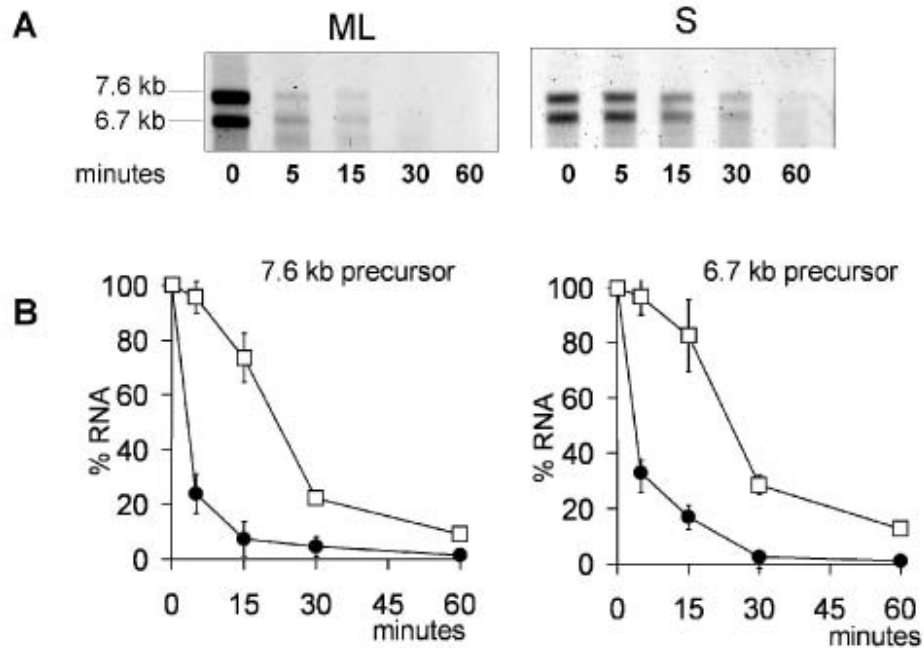
ribosomales 24S  $\alpha$  y 24S $\beta$  son degradadas con similar velocidad en las fases logarítmica y estacionaria; mientras que el RNAr 18S se degrada ligeramente más rápido en la fase logarítmica.



**Figura 21: Perfiles de degradación de RNAr en las fases logarítmica y estacionaria.** A partir de los electroferogramas de la figura 19 se midieron de manera individual la reducción de la concentración relativa de las principales especies de RNAr: 18S, 24S  $\alpha$  y 24S  $\beta$ . En estos cálculos el tiempo 0 se tomó como la referencia y se le dio el valor de 100%. Las gráficas son el promedio de 5 experimentos

Las diferentes moléculas maduras de RNAr provienen todas de un RNA precursor que atraviesa por varios pasos de maduración. Es posible observar moléculas precursoras que representan los diferentes pasos de tal maduración. Así se distinguen moléculas de 7.6 y 6.7 Kb. Éstas son también suficientemente abundantes para verlas en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Debido a esto es que en los geles hechos con las muestras de los ensayos de degradación también se analizó la degradación de estas moléculas (fig. 22 a). La densitometría

de las bandas de los precursores mostró que ambos se degradan ~3 veces más rápido en fase logarítmica, que en fase estacionaria (fig. 22b).



**Figura 22: Cinética degradativa de precursores de RNAr.** a) Imagen en negativo de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, muestras provenientes de ensayos de degradación, que permite ver la disminución de la intensidad de las bandas de los precursores ribosomales en fase logarítmica (ML) y en fase estacionaria (S). b) Comportamiento promedio de la degradación de los precursores ribosomales. Fase logarítmica (●), fase estacionaria (□). Promedio de 5 experimentos independientes. El tiempo cero se tomó como 100% y el resto de los tiempos en función del valor inicial.

### 3.3.4 Estabilidad del RNAm de genes de expresión estadio específica

Ya que el fenómeno de estabilización lo observamos para mensajeros de genes de mantenimiento quisimos observar cual era el comportamiento de genes de expresión

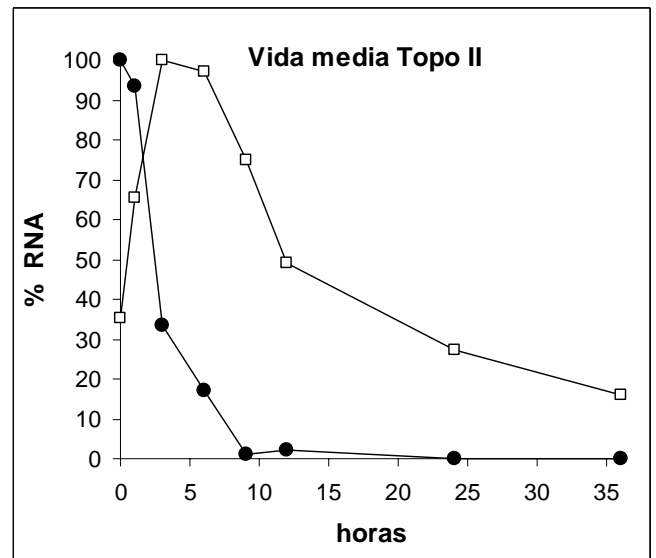
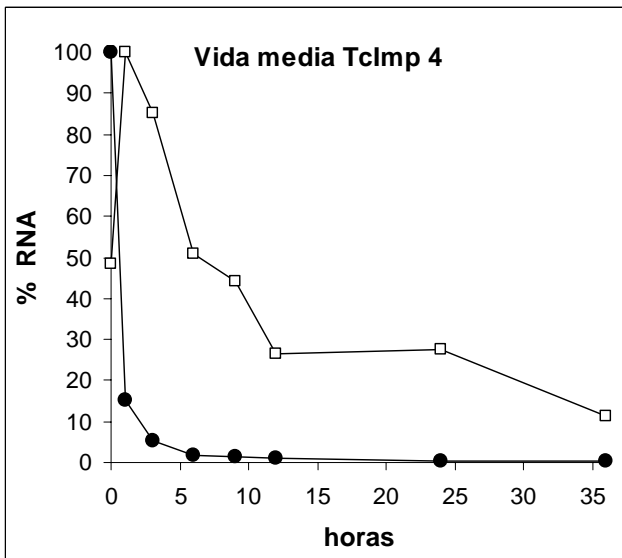
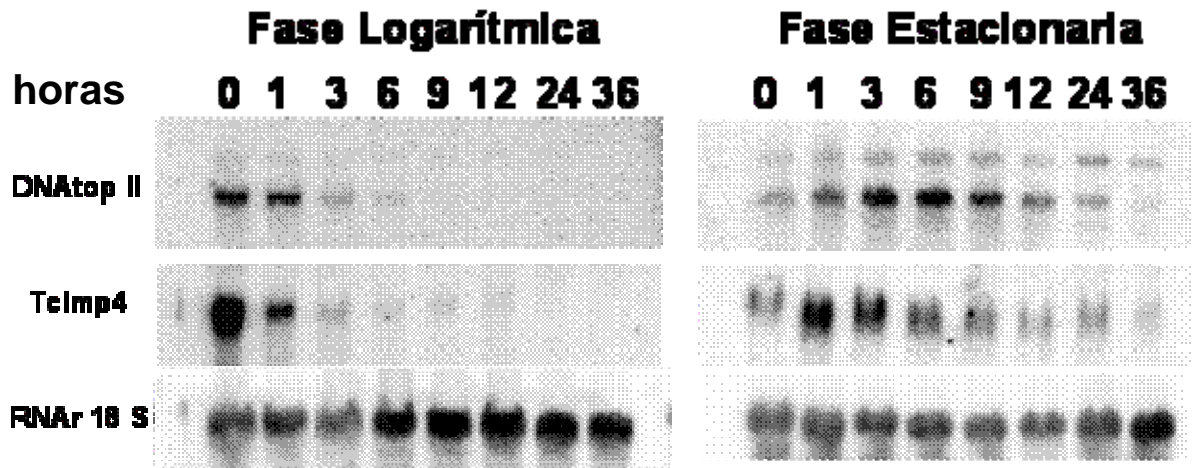
estadio específica. Particularmente se optó por analizar genes que se expresan en epimastigotes y que se encuentren en copia única.

Se encontró que los genes codificadores de la DNA topoisomerasa II (Fragoso *et al.*, 1998) y de TcImp4 (Fragoso *et al.*, 2003) cumplían con las condiciones mencionadas. A partir de las secuencias reportadas se diseñaron oligonucleótidos para cada uno de los genes con la intención de amplificar fragmentos de DNA correspondiente, para después clonarlos en el vector TOPO. Las clonas fueron corroboradas por secuencia nucleotídica y después usadas como sonda en ensayos tipo northern.

El experimento de vida media se realizó de la misma forma que para los genes de mantenimiento. En estos casos observamos el mismo patrón observado en los RNAm de genes de mantenimiento: los RNAm son más estables en fase estacionaria que en fase logarítmica (tabla 2 y fig. 23).

<b>RNAm</b>	<b>ML</b>	<b>S</b>
TcImp4	0.59	7.54
DNA topo II	3.14	12.36

**Tabla 2** Vida media en fase logarítmica (ML) y estacionaria (S) de RNAm de genes de expresión exclusiva en epimastigotes.



**Figura 23: Determinación de la estabilidad del RNAm de dos genes de expresión única en epimastigotes.** En el panel superior se observan las hibridaciones obtenidas de cada RNAm analizado. Como control de carga se usó el RNAr 18S. En las gráficas se observa el decaimiento en fase logarítmica (●) y el de fase estacionaria (□). Los valores corresponden a porcentaje observado, tomando como valor de referencia el punto que presentó mayor intensidad. DNA<sup>top</sup> II: DNA topoisomerasa II; TcImp4s: Imp4 de *T. cruzi*.

### **3.3.5 Diversidad de RNAsas presentes en el genoma de *T. cruzi***

En el decaimiento de RNA se encuentran involucradas una gran cantidad de proteínas diferentes (Garneau *et al.*, 2007); los modelos biológicos en los que mejor se ha descrito la maquinaria de degradación de RNA son *S. cerevisiae* y células de mamífero (humano, ratón, rata). Para saber que tan extensa es la maquinaria degradativa de RNA en *T. cruzi* con referencia a los modelos mencionados se realizó una búsqueda dentro de la anotación del genoma.

Se encontraron anotados en el genoma de *T. cruzi* genes alrededor de 40 secuencias codificantes de genes homólogos de las principales enzimas del decaimiento: CCR4, NOT, DCP 1, DCP2, Lsm, DcpS, *Xrn1* y algunos miembros del exosoma (tabla 3).

Paso del decaimiento	Nombre del gen en <i>T. cruzi</i>	Homólogos encontrados	ID genoma de <i>T. cruzi</i>
<b>Desadenilación</b>	Factor asociado a CCR4	Similar a de-adenilasa POP2 de <i>D. melanogaster</i> .	Tc00.1047053510535.60 Tc00.1047053511827.60
	Ribonucleasa putativa.	Similar a PARN (CAF 1) de <i>X. laevis</i> .	Tc00.1047053504427.200 Tc00.1047053507221.20
	proteína hipotética, ribonucleasa putativa	Similar a ribonucleasa específica de Poli A de <i>D rerio</i>	Tc00.1047053506251.100 Tc00.1047053508231.74
	Ribonucleasa putativa	Similar a PARN (CAF 1) de <i>P. tetraurelia</i> .	Tc00.1047053510655.110 Tc00.1047053510751.10
<b>Decapping</b>	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm5p	Similar a LSm 5 de <i>S. cerevisiae</i>	Tc00.1047053506943.114 Tc00.1047053509065.124
	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7p	Similar a LSm 7 de <i>S. cerevisiae</i>	Tc00.1047053503479.49 Tc00.1047053506855.209



<b>Degradación 3'-5'</b> <b>Miembros del</b> <b>exosoma</b>	Proteína de procesamiento de RNAr 41A. Exoribonucleasa putativa del complejo del exosoma	RRP41A exonucleasa componente del exosoma de <i>T. brucei</i>	Tc00.1047053509715.9 Tc00.1047053510105.20
	Proteína de procesamiento de RNAr 41B; exoribonucleasa 3'-5' putativa	Exoribonucleasa asociada a exosoma	Tc00.1047053503653.30 Tc00.1047053505037.20
	Proteína asociada al exosoma 4; exoribonucleasa 3'-5' putativa	Similar a proteína asociada al exosoma de <i>T. brucei</i> , involucrada en la maduración de RNAr. Similar a Ski6p de chimpancé y al componente 6 del exosoma de <i>D. rerio</i> .	Tc00.1047053507841.34 Tc00.1047053508269.60
	Proteína asociada al exosoma 2; exoribonucleasa putativa.	Similar al componente 9 del exosoma de <i>G. gallus</i> , componente 8 del exosoma de <i>D. rerio</i> , RRP45 de <i>D. melanogaster</i>	Tc00.1047053504085.20 Tc00.1047053507089.80
	Proteína de procesamiento de RNAr 45; exoribonucleasa putativa 3'; miembro putativo del exosoma.	Similar a RRP45 componente del exosoma <i>T. brucei</i>	Tc00.1047053506863.50 Tc00.1047053511825.260
	Exonucleasa putativa del exosoma. Proteína 4 del procesamiento de RNAr.	Similar a RRP4p componente del exosoma de <i>T. brucei</i>	Tc00.1047053508859.109 Tc00.1047053510167.29
	Proteína 40 del procesamiento de RNAr. Exonucleasa, miembro putativo del exosoma.	Similar a ribonucleasa RRP40 componente del exosoma	Tc00.1047053506625.200

	Homólogo de RRP44p; proteína tipo ribonucleasa II.	Similar a exonucleasa RRP44 asociada a exosoma (Dis 3)	Tc00.1047053508241.120 Tc00.1047053509595.50
	Proteína 6 del procesamiento de RNAr. Miembro del exosoma.	Homólogo de RRP6p componente de exosoma de <i>T. brucei</i> .	Tc00.1047053504057.110
	Proteína 3 asociada al exosoma. Ribonucleasa 3'.	Proteína nuclear asociada a exosoma, procesamiento 3'-5'.	Tc00.1047053509153.70
	Exonucleasa 5'-3' XRNA putativa; exoribonucleasa 1 putativa.	Miembro de la familia <i>Xrn</i> de ribonucleasas 5'-3'. Similar a <i>Xrn A</i> de <i>T. brucei</i>	Tc00.1047053507817.80 Tc00.1047053505939.89 Tc00.1047053506351.9
<b>Degradación 5'-3'</b>	Exonucleasa 5'-3' XRNB, putativa. Exoribonucleasa 2 putativa.	Miembro de la familia <i>Xrn</i> de ribonucleasas 5'-3'. Similar a <i>Xrn B</i> de <i>T. brucei</i> .	Tc00.1047053507087.80 Tc00.1047053511305.10
	Exonucleasa 5'-3' XRNC, putativa; exoribonucleasa 2, putativa.	Miembro de la familia <i>Xrn</i> de ribonucleasas 5'-3'. Similar a <i>Xrn C</i> de <i>T. brucei</i> .	Tc00.1047053504427.130 Tc00.1047053507221.80 Tc00.1047053509331.9
	Exonucleasa 5'-3' XRND, putativa; exoribonucleasa 2, putativa.	Miembro de la familia <i>Xrn</i> de ribonucleasas 5'-3'. Similar a <i>Xrn D</i> de <i>T. brucei</i> .	Tc00.1047053507641.80

**Tabla 3: Componentes de la maquinaria de decaimiento encontradas en la anotación del genoma de *T. cruzi*.**

## 4 DISCUSIÓN

### 4.1 Sobre la organización genómica del locus de la proteína ribosomal S4 en *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brenner

La cepa CL Brenner está clasificada como miembro del subgrupo IIe (Westenberger *et al.* 2005). Esta fue la cepa empleada para obtener la secuencia del genoma de *T. cruzi*. Es también la cepa usada en nuestros estudios, por lo que una vez que fue liberada la secuencia del genoma de *T. cruzi*, se esperaba encontrar en ésta lo mismo que secuenciamos. Así que resultó algo inesperado que el alelo 1, con dos copias, secuenciado por nosotros tuviera varios cambios con respecto a la secuencia hallada en la base de datos del genoma. Además es interesante que la mayoría de estas diferencias estén en regiones codificadoras, tanto en las copias de S4 como en el marco de lectura abierto que corresponde al transportador de nucleósidos localizado río abajo. Un posible escenario en la evolución de estos alelos podría ser que la condición primitiva fuera la encontrada en el alelo de una copia. Más adelante por un evento de duplicación es posible que se presentara la segunda copia. Este escenario explicaría por que entre los alelos no Esmeraldo y Tulahuén la única diferencia radica en una copia extra de S4. Este arreglo de tres copias de S4 en dos alelos es una condición conservada en los tres tripanosomátidos cuyos genomas se han secuenciado hasta ahora: *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania major*. Es posible que este arreglo fuera adquirido desde un ancestro común.

Por otro lado también es probable que el alelo Esmeraldo sea lo suficientemente antiguo para haber acumulado los cambios que se observan. Este alelo debe haberse visto sometido a presiones de selección particulares para presentar cambios incluso en regiones codificadoras (S4 y transportador de nucleósidos).

De acuerdo con Brisse *et al.*, 1998, las cepas CL Brenner y Tulahuén son muy parecidas entre sí, tanto que estos autores sugieren que existen frecuentes errores en su clasificación. Por otro lado aunque las poblaciones de *T. cruzi* mantiene una estructura clonal esto no excluye la posibilidad de intercambio génico, pero se entiende que éste no ocurre con la suficiente frecuencia para empezar a considerar a las clonas como entidades separadas (Telleria *et al.*, 2004).

La cepa Esmeraldo es miembro del grupo IIb, es homóciga para un alto número de loci. Por esta razón es que el consorcio responsable del genoma de *T. cruzi* se encuentra secuenciando también esta cepa (El Sayed 2005 a). La información de la cepa Esmeraldo permite el reconocimiento del origen de alelos génicos dentro de la cepa

De aquí que en la notación del genoma se haga la distinción entre los dos haplotipos que conforman a la CL Brenner, por lo que a algunos locus se les denomina “tipo Esmeraldo” mientras que al otro se le llama “no Esmeraldo”.

Los transcritos de tripanosomátidos deben ser madurados por *trans* splicing y poliadenilación. El análisis de 32 secuencias de clonas de cDNA y su comparación con las secuencias genómicas permitió determinar los sitios de procesamiento de los RNAm de *prS4* de cada copia de este gen. Los RNAm que resultan de cada copia S4 son todos diferentes a consecuencia de sus regiones no traducidas. Se ha demostrado que diferencias en las regiones no traducidas resultan en diferencias en estabilidad de transcritos específicos en tripomastigotes y amastigotes (Bartholomeu *et al.*, 2002). Como una hipótesis se propone que los diferentes UTR presentes en los mensajeros de S4, posiblemente participan en patrones de expresión de esta proteína.

#### **4.2 De los niveles de RNAm de genes de mantenimiento en epimastigotes en cultivo de *T cruzi* CL Brenner**

Debido a que se considera que la transcripción por RNA polimerasa II es más bien constitutiva en los tripanosomátidos no se esperaban grandes variaciones en los niveles del transcrito de S4 como se observó. Pero como en células en fase estacionaria se disminuye la traducción y por ello los requerimientos por componentes ribosomales (Gray *et al.*, 2004), decidimos descartar que la variación de los niveles de RNAm fuera exclusiva de productos ribosomales. De ahí que analizamos transcritos de tres genes de mantenimiento.

Las variaciones de los niveles de los cuatro transcritos analizados (actina, S4, TIM y TR), coinciden con lo descrito para  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina (González-Pino *et al.* 1999), y no se explican por fenómenos post transcripcionales. De hecho de acuerdo con Elias *et al.* 1995 y con algunos datos nuestros (no mostrados), la actividad transcripcional es de 7 a 11 veces menos en la fase estacionaria que en la fase logarítmica, lo que correlaciona directamente con el bajo nivel de RNA que encontramos. Es posible que la disminución de la actividad transcripcional sea una consecuencia directa de la condensación de la cromatina. Hay observaciones de que conforme se da la progresión de la fase logarítmica a la estacionaria en los epimastigotes el estado de su cromatina se condensa progresivamente (Spadiliero *et al.* 2002 a y 2002 b; Belli 2000). En estos estudios se probó que en los epimastigotes de fase logarítmica la cromatina se encuentra laxa y más susceptible al corte con DNAsas que en la fase estacionaria donde la cromatina se encuentra condensada. Es posible por otro lado que esto sea un mecanismo de respuesta al agotamiento de nutrientes en el medio, particularmente a la escasez de glucosa, ya que según algunas observaciones del laboratorio este es un nutriente limitante para el crecimiento de epimastigotes.

#### **4.3 Los transcritos de fase estacionaria son más estables que los de fase logarítmica en epimastigotes de *T. cruzi*.**

La evidencia experimental existente al momento ha demostrado que en *T. cruzi* la regulación de su expresión génica ocurre fundamentalmente por mecanismos post transcripcionales (Teixeira, 1998, Clayton, 2002). Por esta razón es que se decidió

determinar la vida media de los RNAm analizados. La hipótesis original era que la duración de la vida media de los transcritos explicaría el descenso abrupto de los niveles de RNAm en la fase estacionaria. Sin embargo lo que encontramos contradujo tal hipótesis.

El significado biológico de la estabilización de RNAm en la fase estacionaria podría estar relacionado con la progresión del ciclo de vida de *T. cruzi*. Los epimastigotes de fase estacionaria y los tripomastigotes, que son el estadio que en condiciones naturales sigue a los epimastigotes tienen disminuida su actividad transcripcional 7 a 11 veces al compararlos con los epimastigotes de fase logarítmica. Sin embargo cuando los tripomastigotes invaden una célula en el hospedero mamífero se transforman rápidamente en amastigotes y estos re-inician el ciclo replicativo en tiempos cortos. Por esto es que la estabilización de transcritos en fase estacionaria puede ser un mecanismo por el cual se asegura una cantidad pequeña de RNA que pueda ser funcional y haga posible el reasumir la producción de proteínas sin necesidad de transcripción tan pronto como las células se encuentren en condiciones de proliferación. Adicionalmente los epimastigotes de fase estacionaria pueden dar lugar a epimastigotes replicativos si se les proporcionan nutrientes frescos, por lo que no es necesaria la metaciclogénesis para que este mecanismo de estabilización de transcritos sea de utilidad. Evidencia de que este es un mecanismo de “resistencia” al estrés nutricional se encuentra en levaduras y en *Bacillus subtilis*, donde se han encontrado transcritos estabilizados como respuesta directa a la privación de glucosa. Esta característica compartida en especies no relacionadas sugiere que es

una estrategia general de supervivencia al estrés nutricional tempranamente desarrollada en el transcurso de la evolución.

#### **4.4 Contribución de la cola de poli A en la estabilidad de RNAm de genes de mantenimiento en epimastigotes de *T cruzi***

La extensión del poli A es una característica importante de esta estructura en los RNAm eucariontes. Un tamaño mínimo es necesario para el movimiento del transcrito fuera del núcleo y para su traducción. En algunos sistemas eucariontes el alargamiento de la cola de poli A por acción de poli A polimerasas citoplásmicas permite que RNAm inactivos, sean incorporados a conjuntos polisomales para su traducción. Más aún en la poliadenilación del SL específicamente en amastigotes de *L. donovani* (Lamontagne *et al.*, 1999) alarga su vida media comparada con los estadios en los que este RNA no es adenilado. En la comparación que se hizo de la longitud de las colas de poli A de los transcritos de actina y S4 no encontramos diferencias significativas entre las fases logarítmica y estacionaria que pudieran explicar la estabilización de transcritos en esta última fase.

Sin embargo, el sistema que se empleó en la medición de la cola de poli A no fue el más apropiado, ya que aún cuando el sistema de oligo dT + RNAsa H ha probado ser útil en otros sistemas (Sallés *et al.*, 2003) en nuestro caso fue de utilidad limitada. Particularmente por que el sistema de detección en geles de agarosa no discrimina bien las bandas de los tamaños encontrados. Probablemente habría sido más



apropiado usar geles de acrilamida, que discriminan moléculas pequeñas o bien sistemas de medición que emplean estrategias basadas en la reacción en cadena de la polimerasa. A pesar de lo anterior, las imágenes obtenidas para medir la cola de poli A indican que aquellas encontradas son pequeñas comparadas con las de levaduras o mamíferos. De haber encontrado esos tamaños (150 a 250 nt) se habrían resuelto mejor las bandas.

#### **4.5 La estabilización de RNAm de genes de mantenimiento en fase estacionaria del cultivo de epimastigotes está acompañada por una disminución de la actividad degradativa general**

A través de los ensayos de degradación que se proponen se obtuvieron cinéticas de degradación para las fases logarítmica y estacionaria. Éstos resultados representan evidencia de que en la estabilización de transcritos en fase estacionaria participa de manera protagónica la maquinaria de degradación de RNA. Sin embargo ésta, tiene muchos componentes y los ensayos de degradación que se proponen aquí no pueden discriminar entre ellos. Por ejemplo se sabe que en *T. brucei* la interrupción por medio de RNAi de las proteínas Lsm 3 y 8 duplica la vida media de al menos dos RNAm (Liu *et al.*, 2004). Como se mencionó anteriormente estas proteínas participan en los procesos de degradación de RNA aparentemente estimulando el proceso de “deccaping” (Garneau *et al.*, 2007).

Aunque los ensayos muestran una degradación diferencial de RNA entre las fases del crecimiento analizadas, no es posible saber si eso se debe a cantidad efectiva de RNAsas, capacidad degradativa de las mismas o por la presencia en fase estacionaria de algún sistema de protección de RNA mediado por proteínas.

Recientemente se encontró que en epimastigotes que son sometidos a condiciones de estrés nutricional se promueve la formación de regiones puntuales en el citoplasma donde se agrupa la población de RNA poli A + (Cassola *et al.*, 2007, Barbieri *et al.*, 2007). Los autores aducen que estos focos de RNAm pueden ser sitios de “protección” para el RNAm, sin embargo es posible que sean sitios desde donde se puedan dirigir para su reentrada a traducción. La protección que brindan estos cuerpos al RNAm no explica las diferencias en la degradación diferencial de precursores de RNAr aquí presentada. Es posible que tanto la formación de estos cuerpos, como la disminución de la actividad ribonucleolítica sean parte de una misma estrategia o respuesta a la ausencia de nutrientes. Ya que estos focos de RNA se desensamblan al enriquecer el medio con glucosa y además permite el mantenimiento del RNA por periodos de hasta 16 horas en que se bloquea la transcripción.

Las especies ribosomales mayores (18 S, 24 S $\alpha$  y 24 S $\beta$ ), son aquellas que se incorporan al ribosoma, por lo que se encuentran inmersos en una matriz de proteínas. Es posible que dicha matriz impida el inmediato acceso de RNAsas, lo que podría explicar la falta de diferencias evidentes en la degradación de esas moléculas en los ensayos de degradación. Sin embargo la degradación de

moléculas precursoras de RNAm es congruente con la acumulación de los productos de degradación. Es probable que si se pudiera seguir la degradación de moléculas de RNAm se observaría un comportamiento similar.

La evidencia obtenida a partir de los ensayos de degradación que proponemos podría ser refinada mediante su empleo sobre un transcrito *in vitro* marcado radioactivamente. Esto descartaría la participación de elementos estructurales inherentes al transcrito en la estabilización de RNA en fase estacionaria.

#### **4.6 Genes que se expresan específicamente en epimastigotes, también se estabilizan en fase estacionaria**

En la descripción original del fenómeno de estabilización de RNAm en fase estacionaria, se emplearon como monitores únicamente genes de mantenimiento. Estos genes se consideran esenciales en *T. cruzi*, debido a la importancia de los eventos en que participan. Debido a que hipotéticamente se trata de un fenómeno global, debería afectar a la población general de RNAm. Por eso se inició el análisis de RNAm enriquecidos específicamente en algún estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. Las proteínas de los blancos elegidos (DNA topoisomerasa II y TcImp4), no se detectan en epimastigotes (Fragoso *et al.*, 1998; Fragoso *et al.*, 2003), sin embargo sus transcritos son también estabilizados como los transcritos de genes de mantenimiento; cuál es el posible significado biológico de esto?, cuál podría ser la importancia de protegerlos? A la fase estacionaria de los epimastigotes en

condiciones naturales le sigue la transformación en tripomastigotes, o bien si el ambiente es enriquecido con glucosa los epimastigotes de fase estacionaria adoptan un comportamiento replicativo, por lo tanto la estabilización de la población general de transcritos podría ser la forma por la cual estas células se preparan para los dos eventos posibles: continuar hacia metaciclologénesis y posteriormente transformarse en amastigotes con una mínima, pero funcional cantidad de RNAm, capaz de ser traducido, o estar preparado para permanecer en el intestino del triatómino y continuar su división como epimastigote cuando el insecto ingiera nuevo alimento.

#### **4.7 La maquinaria de degradación de RNA de *Trypanosoma cruzi* es similar a la descrita en levadura y mamíferos**

Los componentes de la maquinaria ribonucleolítica que encontramos en la anotación del genoma de *T. cruzi* sugieren que en este organismo se encuentran las mismas vías de degradación de RNA que las descritas en eucariontes superiores (levadura y mamíferos).

Se encontraron componentes tanto de la vía dependiente de desadenilación como de la independiente. Aunque estrictamente no se encontraron enzimas que llevan a cabo el “decapping”, sí se hallan proteínas Lsm cuyo papel es facilitarlos. A diferencia de lo que ocurre en levaduras donde solo hay 2 isoformas de *Xrn*, en *T. cruzi*, hay nueve secuencias que corresponden a 4 isoformas. Éstas han sido descritas funcionalmente en *T. brucei* (Li *et al.*, 2006). *Xrn A* es el homólogo más parecido a *Xrn1* de levadura, la principal ribonucleasa en ese organismo responsable de la

degradación de RNAm que también está involucrada en procesamiento de RNAr y de snoRNAs. *Xrn A* y *Xrn D* son esenciales para el crecimiento de *T. brucei*. Por otro lado *Xrn B* y *Xrn C* son de localización citoplásmica mientras que *Xrn D* es nuclear. *Xrn A* aparentemente se presenta en ambos compartimentos celulares. Estos genes también se encuentran en *L. major* y debido al alto grado de conservación encontrado se presume que todos son funcionales.

De los componentes del exosoma, en *T. cruzi* se encontraron los mismos elementos previamente hallados en *T. brucei*: Rrp 40, Rrp 4, Rrp 45, Rrp 41 a y b, Rrp 44 así como Rrp 6. Este último en eucariontes superiores es un componente exclusivo del exosoma nuclear, sin embargo en *T. brucei* se le encontró también en el exosoma citoplásmico (Estévez *et al.*, 2001). Todos estos componentes son exonucleasas 3'-5' putativas. En el exosoma de *T. brucei* se encuentran cuatro elementos más que no parecen tener similitud con alguno de los componentes del exosoma de mamíferos o de levadura.

Se encontraron ocho secuencias que codifican para desadenilasas, seis de ellas son similares a PARN, la principal desadenilasa de líneas celulares de mamífero (Gao *et al.*, 2000). Esta desadenilasa es dependiente de cap e inhibida por proteínas que se asocian a éste (Garneau *et al.*, 2007). En *T. brucei* se describió una desadenilasa similar a PARN, como ésta es sensible a sulfato de neomicina y se inhibe ante la presencia de la proteína de unión a poli A (PABP 1), pero a diferencia de aquella es independiente de cap (Milone *et al.*, 2004). También se encontraron en la anotación del genoma 2 secuencias similares a POP2, también llamada Caf 1. Esta proteína

es la principal desadenilasa en *S. cerevisiae*, aunque también está presente en mamíferos (Garneau *et al.*, 2007).

Estos hallazgos sugieren en *T. cruzi* la maquinaria de degradación de RNA es similar a la que se ha descrito en *T. brucei* y en eucariontes superiores. Cabe mencionar que del total de los genes encontrados en el genoma de *T. cruzi*, sólo al 50% de ellos fue posible asignarle un nombre en función de similitudes encontradas con homólogos putativos en otras especies. El resto no tiene una función asignada todavía. Ya sea por que se trata de genes exclusivos de esta especie o por que se encuentran muy divergentes de sus homólogos, y es imposible alinearlos entre sí (El Sayed *et al.*, 2005 a). Esto explicaría por que aún no se encuentran anotadas proteínas similares a NOT o a DCP 1 o DCP2.

Hasta el momento no existe evidencia o descripción, en algún modelo biológico de que los componentes de las diferentes vías de degradación (ribonucleasas) estén regulados por el desarrollo, aún más no se tiene conocimiento de que estén inactivos en la fase estacionaria, por lo anterior se puede especular que las proteínas involucradas en el fenómeno que estamos describiendo podría ser cualquiera de los componentes.

## 5 CONCLUSIONES

La fluctuación en los niveles de RNAm de genes de mantenimiento observada en cultivos de epimastigotes aparentemente depende de la tasa de transcripción de los mismos, sin la probable participación de procesos post transcripcionales.

Hemos encontrado lo que parece ser un sistema global de regulación en el que durante la fase estacionaria se incrementa la estabilidad de los RNAm y de precursores de RNAr.

El mecanismo por el cual los transcritos son estabilizados en fase estacionaria se desconoce pero los resultados sugieren que es consecuencia de un descenso de la actividad ribonucleolítica general.

Ya que epimastigotes en fase estacionaria tienen una sobre vida de semanas, la estabilización de transcritos puede facilitar el re inicio del ciclo replicativo cuando las condiciones ambientales así lo permitan.

Como perspectivas, se tiene contemplado el análisis de elementos individuales de la maquinaria de degradación de RNA. Para lo cual no se descarta el diseño de mutantes. También se ha planeado el mejoramiento de los ensayos de degradación aquí propuestos y su empleo en transcritos in vitro marcados. El estudio de las señales ambientales que dirigen el establecimiento de la estabilización de transcritos es otro aspecto del problema que se piensa abordar.

## **6 MATERIALES Y METODOS**

### **6.1 Cultivo de epimastigotes**

Los epimastigotes se cultivaron a 28°C en medio LIT (liver infusión triptone medium) complementado con suero bovino fetal inactivado al 10%, Penicilina 100 U/ml, Estreptomycin 100 µm/ml y Hemina 10 mg/ml. El cultivo siempre se inicia a  $1 \times 10^6$  células / ml. Desde el principio y hasta la fase estacionaria pasan alrededor de 15 días. El crecimiento del cultivo es determinado por cuentas diarias.

### **6.2 Definición de las fases logarítmica y estacionaria**

En nuestro sistema experimental la fase logarítmica corresponde al punto en que el cultivo se encuentra a  $8 \times 10^6$  células / ml de densidad mientras que la fase estacionaria es cuando al hacer la cuenta diaria del cultivo, no se registra un aumento en su densidad por 72 hrs.

### **6.3 Consideraciones sobre el manejo de RNA**

Todo el material empleado para el manejo de RNA es lavado en agua tratada con DEPC y horneado la noche previa a su uso, en el caso de la cristalería. Las cámaras de electroforesis usadas son sólo para RNA y se lavan también con agua DEPC. Lo anterior para evitar en lo posible la degradación de la muestra.

### **6.4 Extracción de RNA**

Para todos los experimentos se usaron muestras de RNA extraído con Trizol de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Brevemente, los parásitos se cosechan centrifugándolos a 3,500 rpm por 8 minutos en centrífuga Beckman Coulter, modelo Allegra 21R. Se lavan una vez con PBS 1X frío, se transfieren a un tubo eppendorf. Se centrifugan de nuevo a 12,000 rpm por 1 min y se elimina el



sobrenadante. Se agrega un ml de Trizol y se homogeinizan las células pipeteando varias veces. La muestra homogeinizada se incuba a temperatura ambiente 5 min. Se adicionan 0.2 ml de cloroformo. Se tapan bien los tubos, se agitan vigorosamente por ~15 seg y se incuban a temperatura ambiente por 2 a 3 min. Las muestras se centrifugan en frío por 15 min a 12,000 rpm. Se recupera la fase acuosa y se transfiere a un nuevo tubo. El RNA se precipita de la fase acuosa adicionando 0.5 ml de isopropanol. Se incuba 10 min a temperatura ambiente y se centrifuga en frío a 10,000 rpm. El sobrenadante se desecha por decantación. La pastilla formada por el RNA precipitado se resuspende en un volumen apropiado de agua tratada DEPC.

## **6.5 Determinación de niveles de RNAm**

Del volumen total de RNA purificado se usa una muestra de 2  $\mu$ l en un gel de agarosa 0.8% para ver la integridad y cantidad relativa del mismo. Cuando se comprueba que el RNA está en abundancia suficiente se precipita con 1/10 de volumen de acetato de potasio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol 100 % a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Se centrifuga por 15 min a máxima velocidad en centrífuga eppendorf, el sobrenadante se desecha por decantación y la pastilla se resuspende en el buffer especial para northern.

Antes de realizar el gel para hacer el northern blot, se hace un gel preparativo para normalizar la carga entre las diferentes muestras. De cada muestra de la curva de crecimiento se toman 2  $\mu$ l para analizarlos en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Con el Molecular Imager FX system se determina por densitometría la abundancia relativa de RNA, usando como control de carga las 3 especies mayores de RNA ribosomal que son muy abundantes y fácilmente visibles. Una vez calculada la carga de las muestras se hace el gel para northern.

## **6.6 Northern blot**

El gel se prepara fundiendo la agarosa en 73 ml de agua tratada con DEPC en horno de microondas, se deja enfriar lo suficiente para poder agregar 10 ml de buffer MOPS / EDTA 10X y 16.2 ml de Formaldehído 37%, se agita suavemente para homogenizar y se vacía en cámara de electroforesis. Se permite gelificar por 1 hora. Se emplea MOPS / EDTA 1X como buffer de corrida. El gel se pre-corre a 60 V por 3 min. Una vez con las muestras el gel se corre a 80 V.

## **6.7 Preparación de sonda con marca radioactiva**

Las sondas empleadas en los diferentes northern blots se elaboraron con el kit de marcaje "Random primers labelling system" de la marca Invitrogen. Brevemente emplea 25 ng de DNA blanco en 20  $\mu$ l de agua. El DNA se hierve por 5 min para su desnaturalización. Se enfría rápido en hielo y se adicionan 2  $\mu$ l de dATP 0.5 mM, 2  $\mu$ l de dGTP 0.5 mM, 2  $\mu$ l de dTTP 0.5 mM, 15  $\mu$ l de la mezcla de random primers, 15 a 20  $\mu$ Ci [ $\alpha^{32}$  P] dCTP, se ajusta el volumen a 49  $\mu$ l, se añade 1  $\mu$ l de Klenow (10 U/ $\mu$ l), se mezcla suavemente y se centrifuga en nanofuga para llevar los contenidos al fondo del tubo. Se incuba a 25 a 30 °C por 2 h. Se agregan 50  $\mu$ l de TE. La sonda se limpia de marca libre y de nucleótidos no incorporados al pasarla por una columna de Sephadex G-50. La sonda se coloca en 15 ml de solución de hibridación (Formamida 50%, Denhardts 4X, SDS 0.2%, buffer de fosfatos 120 mM, SSC 2X, EDTA 2 mM pH 8). Antes de su uso la sonda se hierve por 5 minutos en baño maría.

## **6.8 Condiciones de hibridación y lavado**

Todas las hibridaciones se hicieron a 42 °C por 12 h. Las membranas se lavaron en una solución de SSC 0.2X y SDS 0.2% a 42 °C durante 30 min, 3 veces.

## 6.9 Determinación de la vida media de RNAm

Al cultivo de epimastigotes se adiciona actinomicina D suficiente para una concentración final de 10  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ . Inmediatamente después de agregar el fármaco se toma la alícuota para el tiempo 0. El resto del cultivo se incuba a 28°C. Se toman alícuotas a diferentes tiempos, en nuestro caso: 1, 3, 6, 9, 12, 24 y 36 h. Las muestras tomadas son lavadas una vez en PBS 1X frío y guardadas a -70°C. Una vez finalizada la cosecha de parásitos se hace la extracción de RNA con Trizol.

## 6.10 Determinación de la longitud de las colas de poli A

Preparaciones de RNA total de fase logarítmica y fase estacionaria son tratados por el método de oligo dT y RNAsa H de acuerdo con Sallés *et al.*, 1999. Brevemente: Una muestra de 60  $\mu\text{g}$  de RNA total se divide en dos tubos, se agrega a los dos 50 pmoles de un oligonucleótido específico que hibrida con la región codificadora del RNAm analizado. A continuación se agregan 25 pmoles de oligo dT sólo a uno de los dos tubos, al otro tubo se le adiciona un volumen equivalente de agua. Los dos tubos se calientan a 65°C por 5 a 10 min, se trasladan a temperatura ambiente y se agregan 4  $\mu\text{l}$  de buffer de digestión 5X (200 mM HEPES [pH 7.9], 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 300 mM KCl). Se añade DTT a una concentración final de 1 mM. Se agrega 1 U de RNAsa H. La reacción se lleva a cabo en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . Se incuba 1 h a 37°C. La RNAsa H degrada específicamente el RNA donde hibridaron los oligonucleótidos empleados. Las muestras se llevan a un volumen de 400  $\mu\text{l}$  con agua DEPC y se extraen una vez con una mezcla 1:1 de fenol-cloroformo. El RNA se precipita con 1/10 de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol 100% a -20°C toda la noche. Se centrifuga a máxima velocidad. El RNA precipitado se resuspende en buffer de carga para northern.

Las muestras se analizan en un northern preparado a partir de un gel 2% agarosa, 6% formaldehído. La diferencia en la migración de las muestras con oligo dT y sin oligo dT proporciona la longitud del poli A. Estos northern fueron hibridados con

sondas específicas correspondientes a los extremos 3' de las regiones codificadoras de los genes de actina y S4. Actina: la sonda hizo a partir de un fragmento de 571 pares de bases que va del nucleótido 720 de la región codificadora del gen de actina hasta el nucleótido 166 del 3' UTR. Para S4 se uso un fragmento de 390 pares de bases que van del nucleótido 553 hasta el nucleótido 80 del 3' UTR.

### **6.11 Secuencia de oligonucleótidos secundarios**

**S4:** 5' GATGAGGTCCACCACC 3' Hibrida en los nucleótidos 494 al 513 de la región codificadora de S4

**Actina:** 5' TGGCACTGTTCGTCACCTC 3' Hibrida de los nucleótidos 679 al 697 de la región codificadora.

### **6.12 Ensayos de degradación de transcritos endógenos**

Se tomaron  $150 \times 10^6$  epimastigotes en cultivo, se lavaron en PBS 1X, y se resuspendieron en 1.96 ml de buffer A (50 mM Tris HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl) para mantener las células en condiciones fisiológicas e isotónicas. Se agregan 40  $\mu$ l de NP-40 10% (concentración final 0.2%). Las células se incuban así por 3 min en hielo para promover una lisis completa pero la menor degradación de RNA posible. Se centrifuga en frío a 5000 rpm por 5 min en centrífuga eppendorf, para eliminar restos celulares y células no lisadas. El sobrenadante se traslada a un tubo nuevo y se incuba a 28 °C. Se tomaron alícuotas de 300  $\mu$ l a 0, 5, 15, 30 y 60 min. Se depositan inmediatamente en 1 ml de Trizol, después se siguen las recomendaciones del fabricante para hacer la extracción de RNA. Se determinó la concentración de RNA de las muestras obtenidas por espectrofotómetro y se analizaron en geles de agarosa 0.8% usando para cada carril 5  $\mu$ g de RNA total. Los geles se tiñeron en bromuro de etidio y se leyeron con el Molecular Imager FX system (BioRad).

Para hacer la estimación de la degradación general se realizó la densitometría de áreas arbitrarias localizadas por debajo del sitio de migración de las bandas mayores de RNAr. Estas áreas se mantuvieron iguales en tamaño para todos los carriles. Se graficó el aumento en el contenido de estas áreas con respecto al tiempo.

La degradación del RNAr se calculó estimando el tamaño de cada banda de RNAr y la disminución de la misma con respecto al tiempo, tomando como 100% el valor a tiempo 0.

Se analizaron un total de cinco experimentos independientes de cada fase y se promediaron los resultados obtenidos. En las gráficas mostradas se presentó el error standard.

### **6.13 Búsqueda de genes de expresión estadio específica**

En la literatura se buscaron reportes de genes cuya expresión es limitada a sólo uno de los estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Una vez que se encontraron algunos candidatos se buscó entre ellos aquellos que se encontraran en copia única dentro del genoma. Con estos dos criterios se eligieron los genes.

### **6.14 Obtención de DNA que codifica para genes de expresión estadio específica**

Se diseñaron oligonucleótidos en regiones específicas dentro de la región codificadora de TcImp4 y DNA TOPO II.

Se hizo un primer PCR empleando DNA genómico de *T. cruzi* de reciente extracción, digerido con la enzima *HindIII*. El programa empleado fue el siguiente: Alineamiento a 61°C por 1 min; extensión a 72°C por 1 min por 20 ciclos.

Una vez comprobado que el producto de PCR tuviera el tamaño esperado, se hizo a partir de éste, un PCR anidado: Alineamiento a 62°C, 1 min, extensión a 72°C por 1

min durante 30 ciclos. Se comprobó en gel de agarosa que el producto tuviera el tamaño esperado.

### **6.15 Oligonucleótidos para amplificar genes de expresión estadio específica**

#### **DNA topoisomerasa II**

1er PCR:

Fw 5' ggAggACATgTggCTCTACgAC 3'

Rv 5' gCATAACTCgCCgCCTTTC 3'

2º PCR

Fw 5' AAgTgCACTTggACgCCC 3'

Rv 5' CACCgTCTCCACCTCAAACC 3'

#### **Tclmp4**

1er PCR:

Fw 5' CgTTCTCgTCACgACgACgTCAC 3'

Rv 5' TCgTCCATCTCAAgCgTCC 3'

2º PCR

Fw 5' TCATggATgCggCgC 3'

Rv 5' ACgTgTggTggCggAAAC 3'

### **6.16 Clonación de genes de expresión estadio específica**

Los productos de PCR fueron clonados empleando el Zero Blunt TOPO PCR cloning kit, de la marca Invitrogen. Se siguieron las instrucciones del proveedor.

De las transformantes obtenidas se hicieron preparaciones a mediana escala de DNA usando columnas QIAGEN diseñadas con este propósito. Estas fueron enviadas a la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para su secuenciación. Las secuencias obtenidas demostraron que los productos correspondían a lo esperado.

## 7 LITERATURA CONSULTADA

1. Abuin G., Freitas-Junior L.H.G., Colli W., Alves M.J.M. y Schenkman S. 1999 Expression of trans-sialidase and 85 kDa glycoproteins genes un *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the post transcriptional level by labile protein factors. Jour Biol Chem 274: 13041-13047
2. Adler B.K., Hajduk S.L. 1994 Mechanisms and origins of RNA editing. Curr Op in Gen Dev 4: 316-322.
3. Agabian N. 1990 Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. Cell 61(7):1157-1160.
4. Alvarez F., Cortinas M.N. y Musto H. 1996 The analysis of protein coding genes suggest monophyli of *Trypanosoma*. Mol. Phylo. Evol. 5:333-343.
5. Andrade Z.A. 1999 Pathogenesis of Chagas' disease. 36<sup>th</sup> Forum of immunology: 126-129.
6. Anonymous 1999 Recommendations from a satellite meeting. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 (Suppl. 1): 429-432.
7. Araújo-Jorge T. 1999 Biology and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*: a 90-years old challenge for scientists. Mem Inst Osw Cruz 94 supp 1: 131-134.
8. Barbieri Holetz F., Correa A., Rodrigues Avila A., Vataru Nakamura C., Krieger M., Goldenberg S. 2007 Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. Bioch Biophys Res Comm 356:1062-1067.
9. Bartholomeu DC, Silva RA, Galvão LM, el-Sayed NM, Donelson JE, Teixeira SM. 2002 *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. Exp Parasitol. 102(3-4):123-33.
10. Belli S. I. 2000 Chromatin remodeling during the life cycle of trypanosomatid. Int J for Parasitol 30:679-687
11. Bentley D. 2005 Rules of engagement: Co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. Curr Op Cell Biol 17:251-256.
12. Bonaldo M., Souto-Padrón T., de Souza W. y Goldenberg S. 1988 Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. J. Cell. Biol. 106:1349-1358.
13. Boothroyd J. C. y Cross G. A. M. 1982 Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exón at their 5' end. Gene 20: 281

14. Borst P., Van der Ploeg, M., Van Hoek J. F. M., Tas J. y James J. 1982 On the DNA content of Trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 6:13.
15. Boucher N., Wu Y, Dumas C, Dube M, Sereno D, Breton M, Papadopoulou B. 2002 A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem.* 277(22):19511-20.
16. Brengues M., Teixeira D., Parker R. 2005 Movement of eukaryotic mRNA between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310:486-489.
17. Bringaud F, Vedrenne C, Cuvillier A, Parzy D, Baltz D, Tetaud E, Pays E, Venegas J, Merlin G, Baltz T. 1998 Conserved organization of genes in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 1;94(2):249-64.
18. Brisse S, Barnabé C, Bañuls AL, Sidibé I, Noël S, Tibayrenc M . 1998 A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Mol Biochem Parasitol.* 1;92(2):253-63.
19. Brown S., Bo Chi T., Williams N. 2001 The *Trypanosoma brucei* mitochondrial ATP synthase is developmentally regulated at the level of transcript stability. *Mol Bio Par* 115:177-187.
20. Burri C y Brun R 2003 American Trypanosomiasis (Chagas disease) en Manson's Tropical diseases. Ed. 21 Editado por Gordon C. Cook y Alimuddin Zumb. Ed Saunders. 1325-1335.
21. Butler J.S. 2002 The yin and yang of the exosome. *TRENDS Cell Bio* 12:90-96.
22. Campbell D. A. 2000 Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. *Parasitol today* 16(2): 78-82.
23. Cassola A, De Gaudenzi JG, Frasch AC. 2007 Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. *Mol Microbiol.* 65(3):655-70.
24. Cevallos AM, López-Villaseñor I, Espinosa N, Herrera J, Hernández R. 2003 *Trypanosoma cruzi*: allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts. *Exp Parasitol*;103(1-2):27-34.
25. Cevallos AM, Pérez-Escobar M, Espinosa N, Herrera J, López-Villaseñor I, Hernández R. 2005 The stabilization of housekeeping transcripts in



*Trypanosoma cruzi* epimastigotes evidences a global regulation of RNA decay during stationary phase. FEMS Microbiol Lett. 15;246(2):259-64.

26. Chagas C. 1909 Nova tripanosomíaze humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. g., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1: 159-218.
27. Chagas C. 1922 Descoberta do *Trypanosoma cruzi* e verificacao da tripanozomíaze americana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 15:67-76.
28. Chapman A. B., Agabian N. 1994 *Trypanosoma brucei* RNA polimerase II is phosphorylated in the absence of carboxyl-terminal domain heptapeptide repeats. J. Biol. Chem. 269:4754-4760.
29. Chaudhuri M., Sharan R., Hill G. 2002. Trypanosome alternative oxidase is regulated post-transcriptionally at the level of RNA stability. J Euk Mic 49:263-269.
30. Chen C, Shyu A. 1994 Interplay of two functionally and structurally distinct domains of the *c-fos* AU-rich elements specifies its mRNA destabilizing function. Mol. Cell Biol. 14: 416-26.
31. Chen C., Shyu A. 1995 AU-rich elements: Characterization and importance in mRNA degradation. Trends Biochem Sci. 20:465-470.
32. Clayton CE. 1999 Genetic manipulation of kinetoplastida. Parasitol Today. 15(9):372-8.
33. Clayton C. 2002 Life without transcriptional control? From fly to man and back again. EMBO J. 21:1881-1888.
34. Collier J. y Parker R. 2005 General translational repression by activators of mRNA deccaping. Cell 122:875-886.
35. Cougot N. Babajko S. y Seraphin B. 2004 Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. J Cell Biol. 165 (1): 31-40
36. Cruz-Reyes A., Pickering-López J.M. 2006 Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years- A review. Mem Inst Osw Cruz 101:345-354.
37. Das A., Bellofatto V. 2004 Genetic regulation of protein synthesis in trypanosomes. Curr Mol Med 4:577-584.
38. Day D. A. Tuite M.F. 1998 Post transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes. Journal of endocrinology 157: 361-371.

39. De Gaudenzi JG, D'Orso I, Frasch AC. 2003 RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo. *J Biol Chem.* 23;278(21):18884-94.
40. Deutscher M. 2006 Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nuc Ac Res* 34:659-666.
41. Di Noia J. M. D'Orso I., Sánchez DO., Frasch A.C. 2000 AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family fo *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J. Biol. Chem.* 275:10218-10227.
42. D'Orso I., Frasch A. 2001 Functionally different AU and G-rich cists confer developmentally regulated mRNA stability in *Trypanosoma cruzi* by interaction with specific RNA-binding proteins. *J Bio Chem* 276:15783-15793.
43. D'Orso I., Frasch A. 2001 TcUBP-1, a developmentally regulated U-rich RNA-binding protein involve in selective mRNA destabilization in Trypanosomes. *J Bio Chem* 276: 34801-34809.
44. D'orso I., De Gaudenzi J., Frasch A. 2003 RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. *TRENDS Par* 19:151-155.
45. Dreyfuss G, Kim N, Kataoka N. 2002. Messenger RNA binding proteins and the messages they carry. *Nature reviews Mol Cel Biol.* 3 March: 195-203.
46. Dreyfus M, Regnier P. 2002 The poly(A) tail of mRNA: bodyguard in Eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell* 111: 611-613.
47. Dvorak J. A. 1984 The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: Biological and medical implications. *J. Cell Biochem.* 24:357-371.
48. Elias M.C., Marques-Porto R., Freymüller E., Schenkman S. 2001 Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Mol Bio Par* 112:79-90.
49. El Sayed N. M., Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R,

- Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B. 2005 Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309:404-409.
50. El Sayed N. M., Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran AN, Wortman JR, Alsmark UC, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton JM, Cerqueira GC, Creasy T, Delcher AL, Djikeng A, Embley TM, Hauser C, Ivens AC, Kummerfeld SK, Pereira-Leal JB, Nilsson D, Peterson J, Salzberg SL, Shallom J, Silva JC, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville SE, Donelson JE, Andersson B, Stuart KD, Hall N. 2005 The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309:409-415.
51. Estévez A. M. y Simpson L. 1999 Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria – a review. *Gene* 240:247-260.
52. Estévez A, Kempf T, Clayton C. 2001 The exosome of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 20(14): 3931-3839.
53. Fairlamb AH. 1990 Trypanothione metabolism and rational approaches to drug design. *Biochem Soc Trans* 18:717-720.
54. Figueiredo R., Rosa D., Soares M. 2000 Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J Par* 86:1213-1218.
55. Figueroa-Angulo E., Maria Cevallos A., Zentella A., López-Villaseñor I., Hernández R. 2006 Potential regulatory elements in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene promoter. *Biochim Biophys Acta*. 1759(10):497-501.
56. Fragoso SP, Mattei D, Hines JC, Ray D, Goldenberg S. 1998 Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase. *Mol Biochem Parasitol*. 94(2):197-204.
57. Fragoso S., Plazaner-Menut C., Carreira M., Motta M., Dallagiovana B., Krieger M., Goldenberg S. 2003 Cloning and characterization of a gene encoding a putative protein associated with U3 small nuclear ribonuclear ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biol Par* 126:113-117.
58. Furger A., Schurch N., Kurath U. y Roditi I. 1997 Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation. *Mol Cell Biol*. 17(8): 4372-4380.

59. Gao M, Fritz DT, Ford LP, Wilusz J. 2000 Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Mol Cell*. 5(3):479-88.
60. Garneau N., Wilusz J. y Wilusz C. 2007 The highways and byways of mRNA decay. *Nature reviews Mol. Cell Biol* 8:113-126.
61. Gilinger G. y Bellofatto V. 2002 Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nuc Acid Res*. 29(7):1556-1564.
62. González-Pino MJ, Rangel-Aldao R, Slezynger TC. 1999 Expression of alpha- and beta-tubulin genes during growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *DNA Cell Biol*. 18(6):449-55.
63. Gray JV, Petsko GA, Johnston GC, Ringe D, Singer RA, Werner-Washburne M. 2004 "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 68(2):187-206.
64. Heckert H., Betschart B., Bender K., Burri M. y Schlimme W. 1994 The chromatin of trypanosomes. *Int. J. Parasitol*. 24:809-819.
65. Hernández R., Díaz-de León F., Castañeda M. 1988 Molecular cloning and characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Par* 27:275-280.
66. Hernández R., Palacios S., Herrera J., Martínez-Calvillo S., López I. 1998 The deduced primary structure of a ribosomal protein S4 from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys A* 1395: 321-325.
67. Hotz H. R. Biebinger S., Flaspohler J., Clayton C. 1998 PARP gene expression: control at many levels. *Mol Biochem Parasitol*. 91:131-143.
68. Huang J, Van der Ploeg LH. 1991 Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO J*. 10(12):3877-85.
69. Irmer H., Clayton C. 2001 Degradation of the unstable EP1 mRNA in *Trypanosoma brucei* involves initial destruction of the 3' untranslated region. *Nuc Ac Res* 29: 4707-4715.
70. Jäger A., De Gaudenzi J., Cassola A., D'orso I., Frasch A. 2007 mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. *PNAS* 104: 2035-2045.

71. Janz L, Clayton C. 1994 The PARP and rRNA promoters of *Trypanosoma brucei* are composed of dissimilar sequence elements that are functionally interchangeable. *Molecular and cellular biology*. Vol. 14 No 9, 5804-5811.
72. Keller W. Y Martin G. 2002 Reviving the message. *Nature* 419:267-268.
73. Kim Yj. y Baker BS. 1993 The *Drosophila* gene *rbp9* encodes a protein that is a member of a conserved group of putative RNA binding proteins that are nervous system-specific in both flies and humans. *Neurosci.* 13(3):1045-56.
74. Kuraishi T, Sun Y, Aoki F, Imakawa S, Sakai S. 2000. The poly(A) tail length of casein mRNA in the lactating mammary gland changes depending upon the accumulation and removal of milk. *Biochem. J.* 347(Pt 2):579-83.
75. Kwak J. E., Wang L., Ballantyne S., Kimble J. y Wickens M. 2004 Mammalian GLD-2 homologs are poly(A) polymerases. *PNAS* 101:4407-4412.
76. Lamontagne J. y Papadopoulou B. 1999 Developmental regulation of spliced leader RNA gene in *Leishmania donovani* amastigotes is mediated by specific polyadenylation. *J. Biol. Chem.* 274:6602-6609.
77. Li, Ch., Irmer H., Freese S., Salm H., Haile S., Estevez A. y Clayton C. 2006 Roles of *Trypanosoma brucei* 5'-3' exoribonuclease homolog in mRNA degradation. *RNA* 12:2171-2186.
78. Liu Q, Liang XH, Uliel S, Belahcen M, Unger R, Michaeli S. 2004 Identification and functional characterization of Lsm proteins in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 279(18):18210-9
79. López-Estraño C., Tschudi C. y Ullu E. 1998 Exonic sequences in the 5' untranslated region of alpha-tubulin mRNA modulate trans splicing in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol.* 18(8):4620-8.
80. Lücke S., Xu G. L., Cross M., Bellofatto V. y Bindereif A. 1996 Spliced leader RNA of trypanosomes: in vivo mutational analysis reveals extensive and distinct requirements for *trans* splicing and cap 4 formation. *EMBO J.* 15:4380-4391.
81. Mangus D, Evans M, Jacobson A. 2003 Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome biology* 4(7): 223.1-223.13.
82. Marquardt W., Demaree R. S. y Grieve R. B. 1990 Parasitology and vector biology. 2a ed. Ed Harcourt Academic Press

83. Martínez-Calvillo M, Hernández R. 1994. *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. *Gene* 142, 243-47.
84. Martínez-Calvillo S, López-Villaseñor I. y Hernández R. 1997. pRIBOTEX expresión vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene* 199, 71-76.
85. Martínez-Calvillo S., Nguyen D., Stuart K. y Myler P. J. 2004 Transcription initiation and termination on *Leishmania* major chromosome 3. *Eukaryot. Cell* 3:506-517.
86. Maslov D. A., Avila H.A., Lake J. A. y Simpson L. 1994 Evolution of RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Nature* 368: 345-348
87. Matthews KR, Tschudi C, Ullu E. 1994 A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev.* 15;8(4):491-501.
88. Miles M. A, Souza A., Pova M., Shaw J. y Laison R. 1978 Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272:819-821.
89. Milone J., Wilusz J. y Bellofatto V. 2004 Characterization of deadenylation in trypanosome extracts and its inhibition by poly(A)-binding protein Pab1p. *RNA* 10:448-457.
90. Myler PJ, Audleman L, deVos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C, Magness C, Rickel E, Sisk E, Sunkin S, Swartzell S, Westlake T, Bastien P, Fu G, Ivens A, Stuart K. 1999 *Leishmania* major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci* 16;96(6):2902-6.
91. Nozaki T. y Cross G.M. 1995 Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 75(1):55-67.
92. Palenchar, JB., Bellofatto V. 2006 Gene transcription in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitology* 146: 135-141.
93. Parker R., Song H. 2004 The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struc and Mol Biol* 11: 121-127.
94. Pays, E., Vanhamme, L., Berberof, M. 1994 Genetic control for the expression of surface antigens in African trypanosomes. *Annu Rev Microbiol* 45: 25-52.
95. Recinos R., Kirchhoff L., Donelson J. 2001 Cell cycle expression of histone genes in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Par* 113: 215-222.

96. Robello C., Gamarro F., Castanys S., Alvarez-Valin F. 2000 Evolutionary relationships in *Trypanosoma cruzi*: molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strains. *Gene* 246: 331-338.
97. Robinson D. R. y Gull K. 1991 Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature* 352: 731-733.
98. Ross J. 1995 mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev.* 59(3):423-50.
99. Sallés F., Richards W., Strickland S. 1999 Assaying the polyadenylation state of mRNAs. *Methods* 17: 38-45.
100. Sbicego S., Alfonzo J., Estévez A., Rubio M.A.T., Kang X., Turck C., Peris M., Simpson L. 2003 RBP38, a novel RNA-binding protein from *Trypanosomatid* mitochondria, modulates RNA stability. *Euk Cell* 2: 560-568.
101. Scheffler I. E. 1999 *Mitochondria* Wiley-Liss. New York, N.Y.
102. Schneider A. 2001 Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. *Int. J. Parasitol.* 31:1403-1415.
103. Shaw G. y Kamen R. 1986 A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46:659-667.
104. Sheet M. D. 1995 Polyadenylation of c-mos mRNA as a control point in *Xenopus* meiotic maturation. *Nature* 374:511-516.
105. Souza W. 1999 A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 supp 1: 17-36.
106. Spadiliero B., Sánchez F., Slezynger T., Henríquez D. 2002 Differences in the nuclear chromatin among various stages of the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Jour Cell Biochem* 84: 832-839.
107. Spadiliero B., Nicolini C., Mascetti G., Henríquez D. y Vergani L. 2002 Chromatin of *Trypanosoma cruzi*: in situ analysis revealed its unusual structure and nuclear organization. *Jour Cell Biochem* 85: 798-808.
108. Spirn A. 2004 The ribosome as an RNA-based molecular machine. *RNA Biol.* 1(1):3-9.

109. Stoeckle MY, Guan L. 1993 High-resolution analysis of gro alpha mRNA poly(A) shortening: regulation by interleukin-1 beta. *Nucleic Acids Res.*21(7):1613-7.
110. Stoeckling G., Mayo T., Anderson P. 2006 ARE-mRNA degradation requires the 5'-3' decay pathway. *EMBO rep* 7:72-77.
111. Stevens J.R., Gibson W. 1999 The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitology today* 15: 432-436.
112. Stevens J. R., Noyes H. A., Schofield C. J. y Gibson W. 2001 The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Advances in Parasitol.* 48: 1-55
113. Sturm N. R., Vargas N., Westenberger S., Zingales B. y Campbell D. 2003 Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J for Parasitol.* 33:269-279
114. Swindle J., Tait A. 1996 Trypanosomatid genetics. En *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*. Ed. Deborah Smith y Marilyn Parsons. Oxford University Press
115. Synetos D., Dabeva M.D. y Warner J.R. 1992 The yeast ribosomal protein S7 and its genes. *J Biol Chem.* 267(5):3008-13.
116. Teixeira, S. 1998 Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31: 1503-1516.
117. Telleria J., Bernabé C., Hide M., Bañuls A., Tibayrenc M. 2004 Predominant clonal evolution leads to a close parity between gene expression profiles and sub specific phylogeny in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biol Par* 137: 133-141.
118. Tibayrenc M., Ward P., Moya A. y Ayala F. J. 1986 Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Prc. Nat. Acad. Sci.* 83:115-119.
119. Tibayrenc M. y Ayala F.J. 1988 Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. Genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42:277-292.
120. Tibayrenc M. 1995 Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.* 36:47-115.
121. Tschudi C. y Ullu E. 1990 Destruction of U2, U4 or U6 small nuclear RNA blocks *trans* splicing in trypanosome cells. *Cell* 61:459



122. Tyler K.M., Engman D.M. 2001 The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J for Parasitology* 31:472-481.
123. Uchiumi T., Kikuchi M. y Ogata K. 1986 Cross-linking study on protein neighborhoods at the subunit interface of rat liver ribosomes with 2-iminothiolane. *J Biol Chem.* 261(21):9663-7.
124. Uliana SRB, Fisher W, Stempliuk V y Floeter-Winter L. 1996. Structural and functional characterization of the *Leishmania amazonensis* ribosomal RNA promoter. *Molecular and biochemical parasitology* 76, 245-55.
125. Ullu E. Matthews KR, y Tschudi C. 1993 Temporal order of RNA processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol. Cel. Biology* 13:720-25.
126. Ullu E. Tschudi C, Günzl, A. 1996 *Trans*-splicing in trypanosomatid protozoa. In *Molecular biology of parasitic protozoa*, ed. Deborah F Smith. Oxford IRL press. 115-33
127. Van Hoof A., Parker R. 2002 Messenger RNA degradation: beginning at the end. *Curr Biol* 12: R285-R287.
128. Vasella E., Braun R., Roditi E. 1994 Control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in a procyclin expression site: a dual role for polypyrimidine tracts in trypanosomes? *Nuc Ac Res* 22:1359-1364.
129. Vickerman K. y Preston T. M. 1976 Comparative cell biology of kinetoplastid flagellates. in Lumsden W.H.R., Evans D. A. eds. *Biology of Kinetoplastida* vol 1. London Academic Press 35-130.
130. Vickerman K. 1985 Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Brit Med Bull* 41: 105-114.
131. Wang L., Eckmann CR., Kadyk L., Wickens M. y Kimble J. 2002 A regulatory cytoplasmic poly(A) polymerase in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 419: 312-16.
132. Westenberger S., Barnabé C., Campbell D. y Sturm N. 2005 Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171:527-543
133. Westenberger S., Sturm N y Campbell D. 2006 *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. *Int. J. for Parasitol.* 36:337-346.

134. Westermann P. y Nygard O. 1983 The spatial arrangement of the complex between eukaryotic initiation factor eIF-3 and 40 S ribosomal subunit. Cross-linking between factor and ribosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*. 741(1):103-8.
135. Weston D., La Flamme A. C. y Ven Voohis W. 1999 Expression of *Trypanosoma cruzi* surface antigen FL-160 is controlled by elements in the 3'-untranslated, the 3' intergenic and the coding regions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102:53-66.
136. WHO The world health report, 2002. (World health organization, Geneva).
137. Wickens M, Bernstein D, Kimble J, Parker R. 2002 A PUF family portrait: 3' UTR regulation as a way of life. *TRENDS in genetics* 18(3): 150-157
138. Zamudio J. R., Mitra B., Ziener G: M., Feder M., Bujnicki J.M., Sturm N. R. y Campbell D. A. 2006 Complete cap 4 formation is not required for viability in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*. 5(6):905-15.
139. Zeiner G., Foldynová S., Sturm N., Lukes J., Campbell D. 2004 SmD1 is required for "spliced leader" RNA biogenesis. *Euk Cell* 3:241-244.
140. Zhao J, Hyman L, Moore, C. 1999 Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiology and molecular biology reviews*. Jun 405-445.

# The stabilization of housekeeping transcripts in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes evidences a global regulation of RNA decay during stationary phase

Ana María Cevallos, Mariana Pérez-Escobar, Norma Espinosa, Juliana Herrera, Imelda López-Villaseñor, Roberto Hernández \*

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-228, 04510 México D.F., México

Received 24 February 2005; received in revised form 17 March 2005; accepted 13 April 2005

First published online 27 April 2005

Edited by D.P. Wakelin

---

## Abstract

The relative steady state concentration of mRNAs of four housekeeping single-copy type *Trypanosoma cruzi* genes (actin, triose-phosphate isomerase, trypanothion reductase and the ribosomal protein S4) was analyzed throughout the growth curve. A distinguishable pattern was observed with maximal levels occurring at the logarithmic phase of growth and minimum levels occurring at the stationary phase. The half-lives of all analyzed messenger RNAs, and also of three molecular species of immature ribosomal RNAs were increased in cells isolated from stationary phase. These results suggest the occurrence of a novel global regulation mechanism that might protect transcripts from degradation in stationary epimastigotes, probably as a strategy to perpetuate through this quiescent stage.

© 2005 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Protozoa; Kinetoplastid; RNA stability; Gene expression

---

## 1. Introduction

*Trypanosoma cruzi* is a parasitic protozoa causative agent of Chagas disease or American trypanosomiasis. During its life cycle this parasite can alternate through vertebrate and invertebrate hosts. In both hosts, *T. cruzi* goes through a cycle that includes infective and non-infective forms and these forms are morphologically identifiable (see [1] for review). Differential gene expression occurs during development of this organism, espe-

cially through post-transcriptional regulation of mRNAs [2]. The extracellular epimastigote forms (present in the digestive tract of the reduvid vector) can be readily cultured in axenic media, and are hence amenable to experimentation. The growth curve of epimastigotes represents a useful tool to analyze differential gene expression throughout a cellular population that changes its morphology, from being rounded or oval cells with a short flagellum during the logarithmic phase of growth to elongated cells with an extended flagellum (over 30 µm) during the stationary phase [1]. Cells in the latter phase can perpetuate for long periods under culture conditions. The stationary phase has been considered an environmental condition where differentiation

---

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 3872; fax: +52 55 5550 0048.

E-mail address: robher@servidor.unam.mx (R. Hernández).

towards non-dividing metacyclic trypomastigotes is triggered [3]. The mechanisms that allow epimastigotes to survive in the stationary phase are unknown. The search for different steady state concentrations of specific mRNAs during the growth curve showed that  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin [4] and actin mRNAs [5] decrease prior to and during the stationary phase. In order to gain insight in the biology of epimastigotes at the stationary phase, and to further analyze a potential modulation of additional RNAs during non proliferative conditions, we investigated: (1) the steady state concentrations of four mRNAs from single-copy type housekeeping genes along the growth curve, and (2) the relative stability of these mRNAs and of three ribosomal RNA precursor molecules from both logarithmic and stationary cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Parasites and culture conditions

*T. cruzi* epimastigotes from the CL Brener strain were grown at 28 °C in liver infusion triptone medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum [3]. In order to obtain reproducible results, the cellular population was homogenized as follows: epimastigotes were maintained in logarithmic growth during at least 3 cycles from  $1 \times 10^6$  to  $30 \times 10^6$  cells per ml, and then diluted to  $1 \times 10^6$  cells per ml to start the actual time course analysis. The number of cells was registered at 24–48 h intervals; the cells were harvested at selected days of the culture during the logarithmic and stationary phases. Mid-logarithmic phase was defined as the time when epimastigotes reached a concentration of approximately  $8\text{--}12 \times 10^6$  cells per ml (days 3–4 post-inoculation). Stationary phase was defined as the time when parasites stopped their growth for 72 h, ( $90\text{--}100 \times 10^6$  cells per ml; days 12–14 post-inoculation). Mid-logarithmic cellular populations were devoid of metacyclic forms while stationary phase cultures had about 5% of metacyclic trypomastigotes as estimated from fixed stained preparations.

### 2.2. Gene probes

To prepare gene probes, DNA fragments were gel purified from the following *T. cruzi* plasmid clones: pD-4, actin genomic clone [5]; pBTR, plasmid bearing a PCR derived coding sequences from the tripanothion reductase (TR) gene [6]; recombinant plasmid composed the pCR II vector carrying a genomic derived PCR amplification product from the triosephosphate isomerase (TIM) gene [7]; pS4-2, cDNA clone from the ribosomal protein S4 (S4) locus [8]. In northern blot analysis of total RNA obtained from epimastigotes in culture, each of these probes recognizes a single mRNA

band at every stage during growth (data not shown). Three ribosomal genomic clones pRTC20, pRTC42 and pRTC32 were also used [9]. All DNA probes were labeled with [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP using a random prime labeling system (*Redi* prime II, Amersham Pharmacia Biotechnology).

### 2.3. Northern blot analyses

Total RNA preparations and northern blot hybridizations were carried out as earlier described [5]. The amount of bound radioactivity on the membranes was detected with the Molecular Imager FX system (BioRad), and quantitation of the samples was done using the Quantity One software (BioRad). The levels of specific mRNAs in each lane were normalized as a ratio to an independent rRNA probe to correct for potential differences in loading (mRNA/rRNA ratio). Values are thereby expressed as a percentage of the maximal ratio obtained for each probe. All RNA size determinations were estimated with the 0.24–9.5 kb RNA ladder (Gibco BRL).

### 2.4. Analysis of RNA precursors' half-life

The half-life of mRNAs was quantitated in northern blots as above with RNA isolated at several time points from cells incubated in the presence of the transcription inhibitor actinomycin D (10  $\mu$ g/ml) [10]. Due to their cellular abundance the amounts of rRNA precursors were detected directly from ethidium bromide stained gels with the Molecular Imager FX system. Their quantification was done using the Quantity One software (BioRad).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Steady state concentrations of mRNAs along epimastigotes growth curve

In the early stages of this work, we were interested to find out whether in culture derived epimastigotes mRNAs other than actin transcripts showed the increase and decrease pattern observed in our previous work [5]. The mRNAs for the TIM, TR and S4 genes were then analyzed in this context. Reproducible results were obtained only when cultures were passaged while in logarithmic growth prior to the start of the experiment. Actin, TIM, TR and S4 mRNAs were analyzed by northern hybridizations of total RNA isolated from the cultures at different time points. Fig. 1 is representative of three independent experiments and shows an increment in the concentration of mRNAs during early stages of the curve followed by a decrease in the stationary phase. In order to analyze the viability of cells in

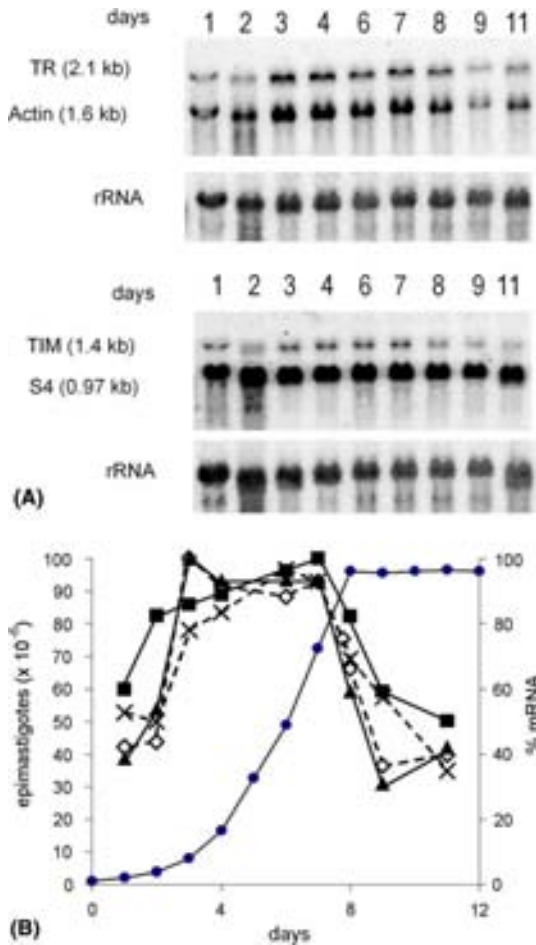


Fig. 1. mRNAs levels during growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Total RNA was isolated from cultured epimastigotes at the indicated days in culture and analyzed with gene specific probes in northern hybridizations (~10 µg/lane, panel A). The observed levels of mRNAs (actin, closed triangles, straight line; S4, closed squares, straight line; TIM, crosses, dotted line; and TR, empty diamonds, dotted line) are depicted in panel B as the ratio of radioactivity in the specific mRNA band/radioactivity of rRNA in the corresponding lane (right, Y-axis). Values were normalized to 100% with the higher ratio for each mRNA series. Solid circles represent the density of epimastigotes per ml (left, Y-axis).

well established stationary phase, the inoculum used to start one of the experimental growth curves were cells from aged cultures, that is, cells that remained in stationary phase for 14 days after growth had stopped. This experiment reproduced a similar pattern albeit there was a delay in the accumulation of steady state concentration of mRNAs in correlation with the observed extended lag phase of the growth curve (data not shown).

### 3.2. Stability of RNAs during growth and stationary phases

Non-dividing epimastigotes from stationary phase can survive for few weeks when transcription of Pol I

and potentially all Pol II transcripts are down regulated [11]. To investigate mechanisms that would support a minimal level of transcripts needed for cellular survival during stationary phase, the stability of the four mRNAs here studied was analyzed from cells at both the mid-logarithmic phase of growth and the stationary phase of growth. A kinetics profile of RNA decay was carried out in cells treated with actinomycin D. The patterns depicted in Fig. 2B are consistent with a heterogeneous RNA population. In any case, it is interesting that all four mRNAs analyzed showed an expanded half-life (at least threefold) in cells from the stationary phase as compared with cells from logarithmic phases of growth (Fig. 2 and Table 1). This result agrees with the report that the half-lives of histone H2A mRNAs are about twice as long in *T. cruzi* epimastigotes from the stationary phase when compared to cells at the logarithmic phase of growth [12]. As a not understood phenomenon, the presence of actinomycin D correlated with an initial short and temporal increase in the concentration of some RNA species. An analogous unexplained effect in mRNAs from *Trypanosoma brucei* has been observed [13].

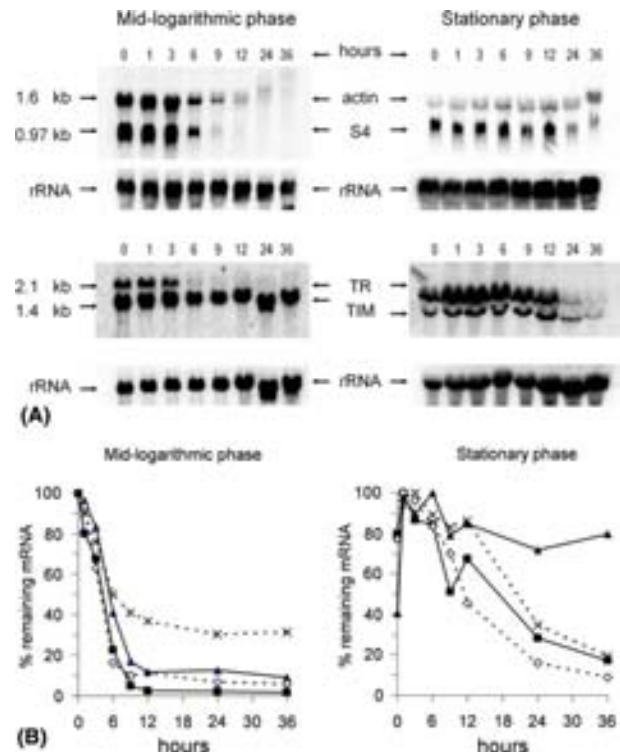


Fig. 2. Differential stability of mRNAs in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes from the mid logarithmic and stationary phase. Panel A: northern blots of total RNA were carried out at different time points after the addition of actinomycin D. Gene specific probes are the same as those depicted in Fig. 1. Panel B, graphs corresponding to half-life of actin (closed triangles, straight line), S4 (closed squares, straight line) TIM (crosses, dotted line) and TR open diamonds, dotted line) mRNAs at both mid-logarithmic and stationary phases of growth.

Table 1  
Half lives of mRNAs and immature rRNAs at both mid-logarithmic (ML) and stationary phases (S) of growth<sup>a</sup>

	ML	S	S/ML
<i>mRNAs</i>			
Actin	5.7	40.6	7.1
S4	4.2	18.3	4.3
TIM	6.9	22.1	3.2
TR	3.8	16.6	4.3
<i>Immature rRNAs</i>			
7.6 kb	1.7	10.8	6.2
6.7 kb	6.8	17.9	2.6
5.3 kb	2.0	11.6	5.7

<sup>a</sup> Results were derived from the lineal regression calculations obtained from the lineal segment of the decay curve and are expressed in hours. The relative stabilization of transcripts was determined by the stationary to mid-logarithmic ratio.

Immature and mature rRNAs species are so abundant that can be visualized from total RNA electropherograms stained with ethidium bromide. This is demonstrated in Fig. 3 where major bands are shown to hybridize with rRNA gene probes. The relative stabil-

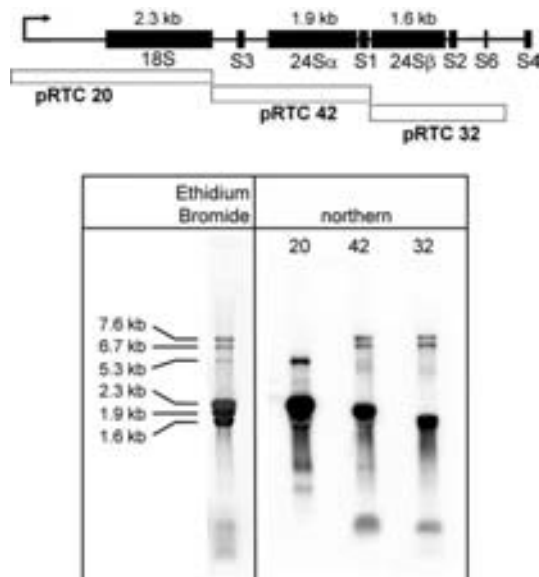


Fig. 3. (Top) Diagram of the rRNA cistron. The coding regions are depicted as solid boxes interconnected by a thin line that represents transcribed spacer regions. The transcription start point is indicated by an arrow [19]. The bars marked as pRTC show three genomic fragments of this region previously cloned [9]. (Bottom) Ethidium bromide profile of total RNA of growing epimastigotes. Total RNA from parasites in the mid-logarithmic phase of growth was extracted and loaded into a non-denaturing TBE, 1%, agarose gel in three identical lanes. The whole gel was stained with ethidium bromide and the negative version of the image was registered using a phosphor imager (Molecular Imager FX, BioRad), only one lane is shown. For the hybridization analysis, the stained gel was equilibrated with the standard MOPS/formaldehyde solution and transferred to a nylon membrane. Each lane was cut separately and hybridized to probes pRTC20, pRTC42, and pRTC32 as indicated (lanes 20, 42 and 32).

ity analysis of the pre rRNAs was therefore carried out from ethidium bromide stained gels (Fig. 4). Similarly to data from mRNAs, the immature rRNAs were found to be more stable in cells from stationary phase (Fig. 4, Table 1). Whether the observed stabilization of pre rRNAs is due to a slower decay and/or a decrease in the rate of processing cannot be distinguished with this experimental approach.

All together, the stabilization of specific mRNAs and immature rRNAs during the stationary phase suggests the occurrence of a post-transcriptional control point associated to the growth phase of *T. cruzi* epimastigotes (at least under culture conditions). Differential stability of mRNAs has been well documented to occur as an important mechanism to regulate differential gene expression during development in kinetoplastids, mainly involving sequences present in their 3' untranslated regions (3' UTR) [14]. In the case of *T. cruzi*, at least two RNA sequence elements present in the 3' UTR of the small type mucin mRNAs either destabilize (AU rich sequences, ARE), or stabilize (G rich elements, GREs) with a *cis* effect on their coding flanking sequences.

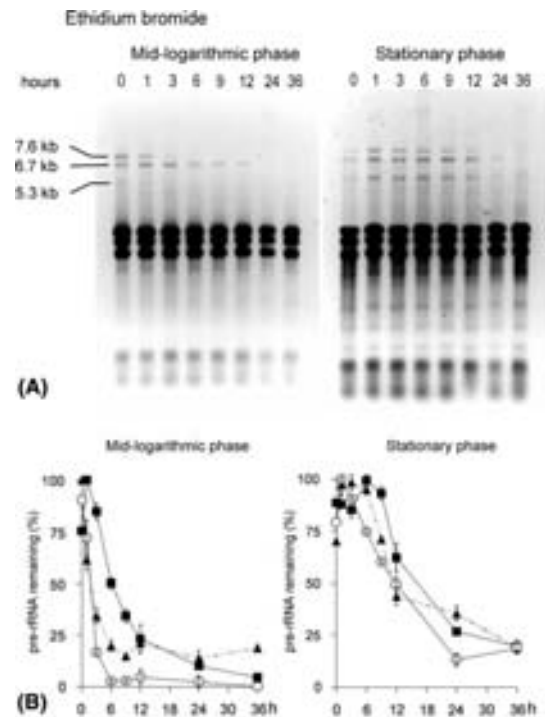


Fig. 4. Half-life of rRNA precursors. (A) Negative image of ethidium bromide stained gels of total RNA (~1 µg/lane) from epimastigotes in mid-logarithmic and stationary phases of growth, at different time intervals after the addition of actinomycin D (10 µg/ml). (B) Kinetics of the rRNA precursors decay after the addition of actinomycin D in mid-logarithmic and stationary phase epimastigotes. Values represent the mean of four independent assays; standard errors are depicted as vertical lines. Open circles correspond to data from the 7.6 kb precursor, closed squares to the 6.7 kb precursor and closed triangles to the 5.3 kb precursor.

Interestingly these two elements seem to function at different developmental stages, ARE functions in trypomastigotes while GREs function in epimastigotes [15,16]. We therefore explored the 3' UTR sequences for the presence of common motifs either in their primary sequence or in the secondary structure using the RNA analyzer software described by Bengert and Dandekar [17]. The analyzed 3' UTRs varied in length and in the percentage of A + U content. No regions with significant homology were identified and in no case were the ARE or GRE motifs found. We also studied the 5' UTRs as they could also be involved in gene expression. The 5' UTR also varied in length and in percentage of A + U content and no regions of homology were identified. Therefore, no correlation between UTR's and differential mRNA stability could be found. It is to point out that this phenomenon includes at least five types of mRNAs (including histone H2A [12]) and three immature rRNA molecular species, therefore it is improbable that a single RNA motif could be involved as the main recognition element. A more likely mechanism may be a general down regulation of the RNA decay (or processing) at stationary phase. It has been demonstrated that transcription by both Pol I and Pol II polymerases is down regulated in non-dividing *T. cruzi* stages and in non-infective cells from stationary phase cultures [11]. Data from our laboratory is in accordance with this observation: the incorporation rate of labeled uridine is about sixfold higher in growing epimastigotes than in cells from the stationary phase, whose activity is registered well above background (data not shown). In *T. brucei* species the RNA synthesis is down regulated in the stationary phase that occurs during differentiation of bloodstream to procyclic forms [18]. In this situation, the stabilization of housekeeping transcripts observed in the present work may be part of a global regulation strategy to compensate for a reduction in transcription.

It is widely accepted that during the stationary phase of culture a small proportion of epimastigotes spontaneously transform into metacyclic trypomastigotes [3]. Therefore the entrance of epimastigotes into the stationary phase can be considered as an onset for differentiation. Metacyclic trypomastigotes are non-dividing infective forms of the *T. cruzi* parasite, that in natural conditions reside in the cloacal region of the alimentary tract of the Triatome vector. Metacyclic trypomastigotes remain there until the insect finds an appropriate host to feed. At the time of feeding the parasites are excreted and upon entrance into a susceptible host they differentiate into dividing amastigotes. A general stabilization of transcripts may therefore be a selected mechanism in these non-dividing forms of *T. cruzi* to maintain a minimal level of expression of housekeeping genes that would allow the parasite to resume growth if environmental conditions turn

favorable for proliferation. The mechanism for this stabilization of RNAs during the stationary phase remains to be determined.

### Acknowledgements

The authors thank Dr. Jorge Tovar and Dr. Ruy Perez-Montfort for their kind donations of recombinant plasmids used in this study, and Dr. Joaquín Sánchez for the critical reading of the manuscript. We acknowledge Lorena Lopez-Griego for technical help. This work was supported by grant IN209302 from PAPIIT and Grants 28036M, 37620M and 45037Q from CONACyT, Mexico. Mariana Perez-Escobar was supported by a scholarship from CONACyT during her Ph.D. Thesis program.

### References

- [1] Tyler, K.M. and Engman, D.M. (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* 31, 472–481.
- [2] Teixeira, S.M. (1998) Control of gene expression in *Trypanosomatidae*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 1503–1516.
- [3] Camargo, E.P. (1964) Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*, origin of metacyclic trypanosomes in liquid medium. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 12, 93–100.
- [4] Gonzalez-Pino, M.J., Rangel-Aldao, R. and Slezzynger, T.C. (1999) Expression of alpha- and beta-tubulin genes during growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *DNA Cell Biol.* 18, 449–455.
- [5] Cevallos, A.M., Lopez-Villaseñor, I., Espinosa, N., Herrera, J. and Hernandez, R. (2003) *Trypanosoma cruzi*: allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts. *Exp. Parasitol.* 103, 27–34.
- [6] Borges, A., Cunningham, M.L., Tovar, J. and Fairlamb, A.H. (1995) Site-directed mutagenesis of the redox-active cysteines of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase. *Eur. J. Biochem.* 228, 745–752.
- [7] Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramirez, J., Becker, I., Berzunza, M., Landa, A., Gomez-Puyou, A., Tuena de Gomez-Puyou, M. and Perez-Montfort, R. (1997) Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 244, 700–705.
- [8] Hernandez, R., Palacios, S., Herrera, J., Martinez-Calvillo, S. and Lopez, I. (1998) The deduced primary structure of a ribosomal protein S4 from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta* 1395, 321–325.
- [9] Hernandez, R., Diaz-de Leon, F. and Castañeda, M. (1988) Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27, 275–279.
- [10] Charest, H., Zhang, W.W. and Matlashewski, G. (1996) The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* 271, 17081–17090.
- [11] Elias, M.C., Marques-Porto, R., Freymuller, E. and Schenkman, S. (2001) Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 112, 79–90.
- [12] Marañón, C., Thomas, M.C., Puerta, C., Alonso, C. and Lopez, M.C. (2000) The stability and maturation of the H2A histone

- mRNAs from *Trypanosoma cruzi* are implicated in their post-transcriptional regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1490, 1–10.
- [13] Irmer, H. and Clayton, C. (2001) Degradation of the unstable EP1 mRNA in *Trypanosoma brucei* involves initial destruction of the 3'-untranslated region. *Nucleic Acids Res.* 29, 4707–4715.
- [14] Clayton, C.E. (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* 21, 1881–1888.
- [15] Di Noia, J.M., D'Orso, I., Sanchez, D.O. and Frasch, A.C. (2000) AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J. Biol. Chem.* 275, 10218–10227.
- [16] D'Orso, I. and Frasch, A.C. (2001) Functionally different AU- and G-rich *cis*-elements confer developmentally regulated mRNA stability in *Trypanosoma cruzi* by interaction with specific RNA-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 15783–15793.
- [17] Bengert, P. and Dandekar, T. (2003) A software tool-box for analysis of regulatory RNA elements. *Nucleic Acids Res.* 31, 3441–3445.
- [18] Pays, E., Hanocq-Quertier, J., Hanocq, F., Van Assel, S., Nolan, D. and Rolin, S. (1993) Abrupt RNA changes precede the first cell division during the differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms into procyclic forms in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 107–114.
- [19] Figueroa-Angulo, E., Martínez Calvillo, S., Lopez-Villaseñor, I. and Hernandez, R. (2003) Evidence supporting a major promoter in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 225, 221–225.



# ***Trypanosoma cruzi* ribosomal protein S4: characterization of its coding locus, analysis of transcripts, and antigenicity of the protein**

**Mariana Pérez-Escobar, Ana María Cevallos<sup>+</sup>, Bertha Espinoza\*, Norma Espinosa, Ignacio Martínez\*, Roberto Hernández**

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología \*Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-228 CP04510, México, D. F., México

*Two allelic genomic fragments containing ribosomal protein S4 encoding genes (rpS4) from Trypanosoma cruzi (CL-Brener strain) were isolated and characterized. One allele comprises two complete tandem repeats of a sequence encoding an rpS4 gene. In the other, only one rpS4 gene is found. Sequence comparison to the accessed data in the genome project database reveals that our two-copy allele corresponds to a variant haplotype. However, the deduced aminoacid sequence of all the gene copies is identical. The rpS4 transcripts processing sites were determined by comparison of genomic sequences with published cDNA data. The obtained sequence data demonstrates that rpS4 genes are expressed in epimastigotes, amastigotes, and trypomastigotes. A recombinant version of rpS4 was found to be an antigenic: it was recognized by 62.5% of the individuals with positive serology for T. cruzi and by 93.3% of patients with proven chronic chagasic disease.*

Key words: kinetoplastid - trypanosomatids - *Trypanosoma cruzi* - ribosome - gene structure

*Trypanosoma cruzi* is a protozoan parasite that causes Chagas disease, an endemic infection in South and Central America that affects approximately 11 million people (Guzman-Bracho 2001). *T. cruzi* species has been classified into two major well defined genomic groups: *T. cruzi* I and *T. cruzi* II (Souto et al. 1996). *T. cruzi* I has been associated with the sylvatic transmission cycle and infection of marsupials whereas *T. cruzi* II has been associated with the domestic transmission cycle and infection of placental mammals. The natural history of the disease involves three different phases. The initial acute infection (symptomatic in only 1% of the cases) is characterized by febrile symptoms and inflammation at the site of entry of the parasite. This stage is followed by an indeterminate (subacute) stage in which symptoms are not apparent. Finally, after a period of years to decades, the chronic stage of the infection may manifest itself in up to 30% of individuals. A variety of clinical presentations may be seen including digestive tract anomalies (megaesophagus and megacolon) and cardiac enlargement and malfunction (Teixeira 1987). The variability of symptoms has yet to be correlated with specific parasite or host genetic markers, although it is likely that both will affect the outcome of infection.

The ribosomal protein S4 (*rpS4*) is a basic type protein located at the interface between ribosomal subunits (Uchiumi et al. 1986). In agreement with this is the ob-

servation that the *rpS4* can be cross-linked to the eukaryotic initiation factor eIF-3 (Westermann et al. 1983). Our early interest in this protein lies with report in which the yeast ribosomal protein S7, homologous to the mammalian *rpS4* was found to be an essential protein (Synetos et al. 1992). From the sequence analysis of two epimastigote cDNA clones it was deduced that *T. cruzi* *rpS4* is a 273 amino acid, conserved basic protein (Hernández et al. 1998). The gene is expressed as a 1 kb transcript and the initial hybridization studies were consistent with the occurrence of two alleles as predicted in a diploid organism. Moreover, Southern blot analysis of pulse field chromosomal gels demonstrated that the genes were present in two homologous chromosomes of different sizes (Hernández et al. 1998).

*T. cruzi* ribosomes are known to elicit both humoral and cellular immune responses (Teixeira & Santos-Buch 1974, 1975). Furthermore, *T. cruzi* ribosomes and ribosomal proteins have been associated with the induction of heart dysfunction in experimental models similar to that seen in patients with chronic disease (Teixeira et al. 1975). The acidic ribosomal P proteins have been found to be antigenic, and the humoral immune responses to these proteins have been implicated in the pathogenesis of chagasic chronic heart disease (Elies et al. 1996, Kaplan et al. 1997, Lopez Bergami et al. 2001). However, the role of other ribosomal antigens has not been evaluated.

In addition to a detailed characterization of the *rpS4* encoding locus this work evaluates the antigenicity of this basic type ribosomal protein.

## **MATERIALS AND METHODS**

*Parasites* - *T. cruzi* II (CL-Brener strain) epimastigotes kindly donated in 1995 by Dr Bianca Zingales (Universidade de São Paulo) have been maintained at 27°C in liver-infusion tryptose medium supplemented with 10% new-born calf serum.

<sup>+</sup>Corresponding author: amcevallos@biomedicas.unam.mx  
MP-E is CONACyT scholarship  
Received 20 October 2006  
Accepted 7 March 2007

**Cloning of the *rpS4* genes of *T. cruzi*** - Genomic DNA from our *T. cruzi* II (CL-Brener strain) was used to construct an *EcoR* I-digested  $\lambda$ ZAP II (Stratagene) library (Cevallos et al. 2003). The library was screened using the *EcoR* I - *Kpn* I *rpS4* encoding fragment from the *T. cruzi* I (Tulahuen strain) cDNA clone pS4-2 (Hernandez et al. 1998). Five positive clones were identified which contained two different inserts 8.5 and 7.5 Kb in size. Two clones p811 (with an 8.5 Kb insert) and p812 (with a 7.5 Kb insert) were selected for further study. The regions containing the homologous sequences were subcloned and both strands sequenced by the dye-terminator method on an ABI-PRISM 310 automated sequencer (Applied Biosystems).

**Expression and purification of a recombinant *rpS4* and recombinant GST** - The entire *rpS4* open reading frame (ORF) was amplified from the genomic clone p812 by PCR with primers containing *Bam*H I restriction sites (S4-GST-F 5'-GGGATCCCCATGACCAAGAAGCACCTG-3' and S4-GST-R 5'-GGGATCCTATTTTCGTGCTTGCG-3'). The amplification product was subcloned in phase into the *Bam*H I site of the bacterial expression vector pGEX-3X (Promega, Madison, Wisconsin), sequenced and expressed as a GST (glutathione S-transferase)-*rpS4* fusion protein in *Escherichia coli* (BL21 strain). *E. coli* transformed with the recombinant plasmid was cultured at 37°C until the optical density reached 0.5 at 600 nm, and the synthesis of recombinant *rpS4* was induced with 1 mM isopropylthio- $\beta$ -galactoside at 37°C for 4 h. The resulting culture was harvested by centrifugation at 12,000  $\times$  g for 10 min at 4°C and incubated in lysozyme containing buffer [100  $\mu$ g/ml in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)] for 30 min at 4°C prior to sonication. A soluble fraction was obtained by centrifugation at 12,000  $\times$  g for 10 min at 4°C. Phosphate buffered saline pH 7.2 (PBS, 10  $\times$ ) and Triton X-100 were added to the soluble fraction to a final concentration of 1% Triton X and 1  $\times$  PBS. The lysate was loaded into a glutathione Sepharose 4B column, and the recombinant protein eluted according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, London, UK). The size and purity of the recombinant protein was verified with the use of SDS-PAGE low molecular weight markers (BioRad Laboratories). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were performed at room temperature in gels (10 or 12%) containing 0.1% SDS, as previously described (Laemmli 1970). Samples were dissolved in sample buffer [1:1 (v/v); 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue] and the electrophoresis conducted in running buffer (25 mM Tris pH 8.8, 192 mM glycine, 0.1% SDS).

Since several contaminant proteins remained in the eluted fraction, a second purification was required. The recombinant protein preparations were resolved by SDS-PAGE (10%) and the band of 57 kDa was cut from the gel and electroeluted from it. After dialysis of the eluted protein in 10 mM Tris-HCl pH 8; 100 mM NaCl, 10% glycerol at 4°C, the preparations were concentrated by

ultra filtration in Centricon® 30 filter units (Millipore Corporation, Bedford, US) and stored at -20°C for further analysis. The GST protein used as a control was expressed directly from the pGEX-3X vector and purified as described above.

**Human sera** - One hundred human sera obtained with the approval of the Ethical Committee of the Instituto Nacional de Cardiología (México, D. F.), were tested for antibodies against the *rpS4* purified recombinant protein. Thirty two sera from infected asymptomatic individuals (indeterminate phase of Chagas disease) previously characterized as seropositive by reactivity to *T. cruzi* crude antigens in two different serological tests [ELISA (cut off value of positive sera was  $\geq$  0.5 of OD at 490 nm) and Western blot]; the details of the standardization of the assays have been published before (Sánchez et al. 2001). Fifteen sera were obtained from chronic cardiomyopathy chagasic patients with different degrees of electrographic alteration and positive serology to three serological tests (ELISA, Western blot, and indirect immunofluorescence). Fifty three samples from serologically negative healthy individuals were used as controls (Rangel-Flores et al. 2001). Sera that were positive to recombinant *rpS4* were also tested against purified recombinant GST protein to demonstrate that the antigenic recognition was against the *rpS4* portion of the fusion protein and not against the GST portion.

**Western blot** - Total proteins from *T. cruzi*, purified recombinant S4 and GST proteins were resolved by SDS-PAGE (12%) and transferred to 0.45  $\mu$ m nitrocellulose membranes (BioRad Laboratories, California, US) in transfer buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.19M glycine and 20% methanol), as previously described (Towbin et al. 1979). Western blots were performed as previously described (Sánchez et al. 2001). Briefly, nitrocellulose membranes were blocked with 10% skimmed milk in PBS (16 h at 4°C). Strips were cut and then individually incubated (2 h at 37°C) with 1 ml human serum diluted 1:500 in 10% skimmed milk in PBS. Each strip was washed three times with PBS/0.1% Tween 20 and incubated with peroxidase-conjugated anti-human IgG (diluted 1:10 000) for 2 h at room temperature. After washing, the reaction was developed with 0.5 mg/ml of diaminobenzidine in PBS with 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reaction was stopped by the addition of water. The presence and correct transference of the recombinant protein was verified by probing with an anti-GST antibody (Affinity BioReagents, Inc.). Sera previously identified as reactive and non-reactive to crude *T. cruzi* antigens were included in the testing of each membrane. Sera that were positive to recombinant *rpS4* were subsequently tested against purified recombinant GST protein to demonstrate that the antigenic recognition was against the *rpS4* portion of the fusion protein and not against the GST portion.

## RESULTS

**Cloning and sequence analysis of the *rpS4* locus** - Screening of a *T. cruzi* II CL-Brener genomic library with a *rpS4* probe identified two positive clones with inserts that corresponded in size to the two expected published

allelic fragments (Hernández et al. 1998). Restriction analysis and Southern hybridizations of the digested clones delimited, in both clones, *Not* I - *Eco*R I fragments recognized by the *rpS4* cDNA probe. These two regions differed in fragment size: 3.4 kb in one clone and 2.4 kb in the other. Both fragments were sequenced and the nucleotide data was deposited in the GenBank (accession nos. DQ288964 and DQ288965). Sequence analyses showed that the difference in size between the two fragments was due to the presence of two *rpS4* gene copies in the 3.4 kb fragment (S4-1 and S4-2) and one copy (S4-3) in the 2.4 kb fragment (see Fig. 1, alleles marked with an asterisk). At the nucleotide level the DNA sequence of both alleles was identical with the exception of a 1072 bp DNA insertion in the two-copy allele containing a 250 bp intergenic region and the extra *rpS4* gene copy (see the "Tulahuen-like" allele in Fig. 1). Sequence comparison with our previously reported *rpS4* cDNA clones from the *T. cruzi* I Tulahuen strain (Gen-

Bank accession nos. AF005421 and AF005904), demonstrated that the three coding regions of our CL-Brener strain were identical to both of them. In particular, the *rpS4-2* gene copy present in our 3.4 kb cloned genomic fragment is not only identical in its coding region but also in its non-coding untranslated regions to the Tulahuen derived *rpS4* cDNA clone. Therefore we have named this allele as "Tulahuen-like".

The *T. cruzi* genome project was carried out in the CL-Brener strain which proved to be a genetic hybrid. The alleles in many cases have been named "Esmeraldo-like" and "non-Esmeraldo-like" haplotypes according to their suspected progenitors. When our *rpS4* coding region was used to search the *T. cruzi* Genome Database (<http://www.genedb.org/genedb/tcruzi/blast.jsp>), two contigs containing *rpS4* genes were identified. Our one copy allele corresponds to the "non-Esmeraldo-like" haplotype. On the other hand, our two copy allele does not correspond in sequence to the accessed "Esmeraldo-

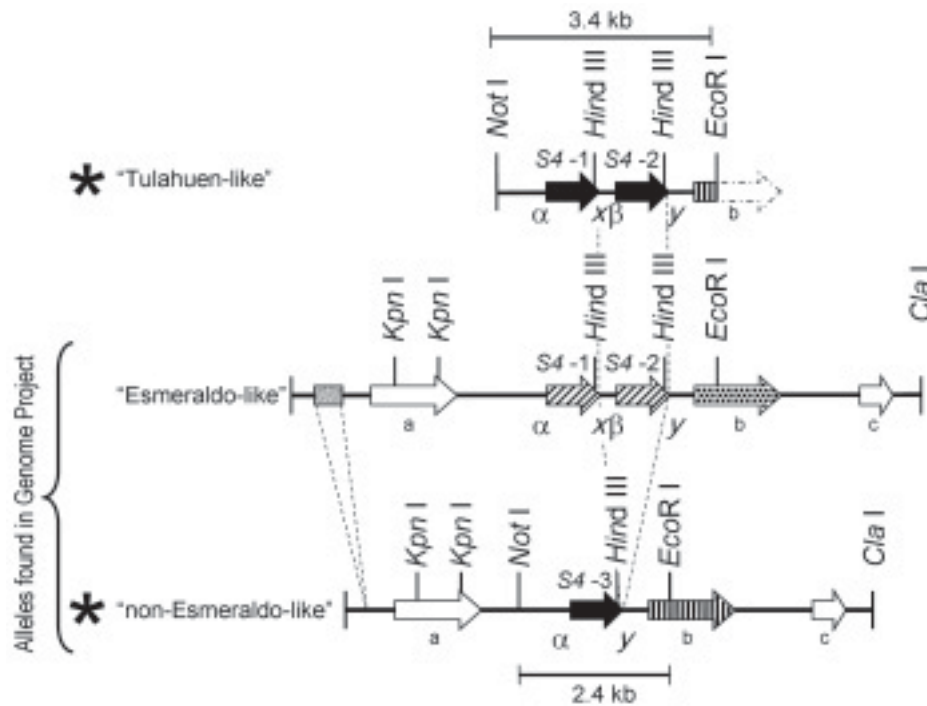


Fig. 1: map of the ribosomal protein S4 genomic locus. At the bottom are depicted the two alleles present in the CL-Brener strain accessed in the Genome Project Database. At the top is represented the variant allele "Tulahuen-like" found in our CL-Brener strain that replaces the "Esmeraldo-like" allele reported in the Genome Project Database. Our second allele corresponds to a "non-Esmeraldo-like". The asterisks mark the two alleles present in our CL-Brener strain and the size of the sequenced fragments are indicated. Arrows represent open reading frames and the shaded box represents a SIRE element. The coding regions for the three copies of the *rpS4* gene are labeled as S4-1, S4-2 and S4-3. The rest of the ORFs are labeled with a letter and encode for a Thiamine pyrophosphokinase (a), a nucleobase transporter (b), and for a hypothetical protein (c). There are two insertions in the "Esmeraldo-like" allele not present in the "non-Esmeraldo-like" allele: a SIRE element and an extra copy of the *rpS4* gene with the corresponding intergenic region (marked with dashed lines).

Differences in arrow patterns represent differences in the nucleotide sequences of the respective ORF. The *rpS4* genes present in the "Tulahuen-like" and in the "non-Esmeraldo-like" alleles (solid arrows) are identical among them but have eight conserved nucleotide differences when compared to the *rpS4* copies 1 and 2 present in the "Esmeraldo-like" allele (arrows with diagonal stripes). In a similar manner, nucleotide sequences of the nucleobase transporter present in the "Tulahuen-like" and in the "non-Esmeraldo-like" alleles (arrows with vertical stripes) are identical among them but present 18 nucleotide differences, that result in five amino acid changes when compared to the "Esmeraldo-like" allele sequence (dotted arrow). Untranslated regions of the *rpS4* genes are labeled as  $\alpha$  and  $\beta$  to indicate the two types of 5' UTR sequences of the *rpS4* genes and as  $x$  and  $y$  to indicate the two types of 3' UTR sequences.

like” haplotype even though this allele also contains two copies of the *rpS4* gene. Differences were found both in the coding and non-coding regions as mentioned in legend to Fig. 1.

A further analysis of the accessed genomic context of the *rpS4* genes detected the presence of a short interspersed repetitive element (SIRE) as defined by Vazquez et al. (1994) in the “Esmeraldo-like” allele (Fig.1). In addition, three ORFs with the same orientation are found in both accessed alleles (Fig. 1 a, b, c). Gene b (a nucleobase transporter) is different in the “Esmeraldo like” haplotype as detailed in Fig. 1.

**Characterization of *rpS4* mRNA processing sites** - Productive expression of protein coding genes in trypanosomes involve the addition of a trans-spliced capped mini exon (39 nt) next to the 5' UTR, and polyadenylation of the 3' terminus within individual mRNAs. These two reactions occur within the intergenic regions of a primary polycistronic mRNAs transcript and are coupled and directed by a common polypyrimidine tract, which is part of the spliced leader acceptor site. Disruption of this bifunctional signal sequence affects the expression of 5' and 3' adjacent flanking genes (Lopez-Estrano et al. 1998, Hummel et al. 2000). Sequence analysis of non coding regions of the *rpS4* genes demonstrated that the 5' upstream region of copies 1 and 3 was identical but significantly different from the 5' upstream sequence of copy 2 (Fig. 1; indicated as  $\alpha$  and  $\beta$ ). The sequences downstream of the translation stop codon for copies 2 and 3 was similar, and in turn dissimilar to the sequence present downstream of *rpS4* gene copy 1 (Fig. 1; indi-

cated as  $x$  and  $y$ ). These differences result in the presence of three types of transcripts that can be readily identified when analyzing cDNA sequence data and allowed us to characterize our previously reported Tulahuen strain derived cDNA clones as copy 2 transcripts.

To determine the sites at which transcript processing occurs for the other two gene copies, a search was performed to identify cDNA clones accessed in the NCBI and EMBL databases. A total of 32 *rpS4* cDNA clones were identified, 21 derived from *T. cruzi* epimastigotes, 6 from amastigotes and 5 from trypomastigotes. The comparison of these sequences with the genomic DNA sequence allowed us to determine the sites where transplicing and polyadenylation occur in each copy (see Fig. 2).

**Antigenicity of ribosomal protein S4** - With the aid of a recombinant form of *T. cruzi* *rpS4* we inferred the antibody response to the natural form of this protein in three well characterized groups: patients with chagasic chronic cardiomyopathy, asymptomatic individuals with two positive serological tests and blood bank donors (Fig. 3). Antibodies against *rpS4* were common in patients with known exposure to the parasite: 20 out of 32 asymptomatic individuals (62.5%) and 14 out of 15 patients with established cardiomyopathy (93.3%). There were no false positives as none of the 53 sera negative for *T. cruzi* (healthy blood bank donors) was reactive to *rpS4*. To analyze the potential recognition of the GST fragment of the recombinant protein, all *rpS4* positive sera were also tested for antibodies against the GST peptide. None of these sera were GST positive (data not shown).



Fig. 2: ribosomal protein S4 genes, flanking sequences, and mapping of mRNA processing sites. Genomic sequences for the three *rpS4* gene copies are aligned (C1- C2, and C3) with their inferred progenitor origin denoted with a T, for a “Tulahuen-like” or nE for “non-Esmeraldo-like”. The *rpS4* encoding regions are not depicted in full. Their position is shown in between the start and stop translation codons (bold). Nucleotides identical to the T-C1 sequence are denoted by dots. Relevant motifs from the spliced leader acceptor site (polypyrimidine tract and dinucleotide AG) are boxed. Polyadenylation sites are highlighted with a shaded box, as the last nucleotide identified different from A. Processing sites for T-C2 were derived from the cDNA sequences AF005421 and AF005904. Transplicing site for copies T-C1 and nE-C3 were derived from sequences AA426688 and CB923834. Polyadenylation site of copy T-C1 was inferred from AA866549.

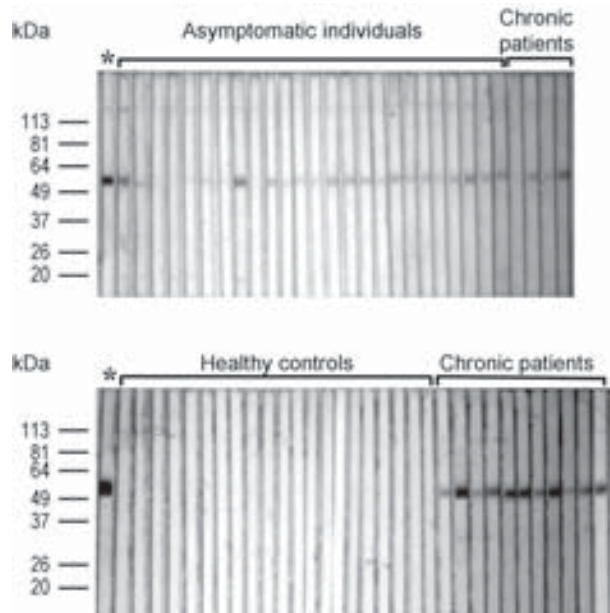


Fig. 3: Western blots against *rpS4*. Gel purified *rpS4* (2.5  $\mu$ g) was loaded in analytical gel slots. Sera from asymptomatic individuals, chagasic patients, and healthy controls were tested. A positive control strip incubated with an anti-GST antibody that recognized the fusion portion of the recombinant protein was included in all blots (marked with an asterisk). Depicted molecular markers correspond to the Benchmark prestained ladder for protein (Invitrogen).

## DISCUSSION

The taxon *T. cruzi* contains two well defined genomic groups *T. cruzi* I and *T. cruzi* II. *T. cruzi* I has been associated with the sylvatic transmission cycle and infection of marsupials. *T. cruzi* II consists of five related subgroups, termed IIa, IIb, IIc, IId, and IIe, and has been associated with the domestic transmission cycle and infection of placental mammals. The *T. cruzi* strain CL-Brener is a member of subgroup IIe and was selected for the genome sequence project because it was well characterized (El Sayed et al. 2005). Although *T. cruzi* lineages have mostly evolved in a clonal fashion, several studies have reported the existence of recombinant genotypes in this species, either in natural populations (Bogliolo et al. 1996, Carrasco et al. 1996, Machado & Ayala 2001) or in the laboratory (Gaunt et al. 2003). In vitro, studies have demonstrated that *T. cruzi* has an extant capacity for genetic exchange. In one report, meticulous quantification analyses demonstrated that biological clones of a single *T. cruzi* strain had between 30 and 70% more DNA than the parental stock indicating some rapid genetic mechanism for radical change in DNA content (McDaniel & Dvorak 1993). In another report two biological clones were passaged together through the entire life cycle and then recovered from the mammalian stage of the life cycle. Comparison of the progeny demonstrated fusion of parental genotypes, loss of alleles, homologous recombination, and uniparental inheritance of kinetoplast maxicircle DNA (Gaunt et al. 2003). Notwithstanding these findings, the recombination events

do not seem to be frequent enough as to disrupt the prevalent clonal pattern of the population (Telleria et al. 2004).

*T. cruzi* CL-Brener, the strain used in this study, is known to be heterozygous at many loci, with different-sized homologous chromosome pairs. It is believed that its genome is a hybrid from subgroup IIb and subgroup IIc (which itself is also apparently a hybrid derived from *T. cruzi* I) (El Sayed et al. 2005). The presence of variant alleles within the same *T. cruzi* subgroup and the presence of two distinct sequence classes representative of different subgroups within particular strains has already been reported (Westenberger et al. 2005). In this work we have cloned and sequenced two alleles containing the *rpS4* genes in a laboratory maintained CL-Brener strain. Sequence analyses demonstrated that one of these fragments corresponds to a different allele from those described in the genome project, and that this variant is probably related to a *T. cruzi* I-Tulahuen strain. The finding of *T. cruzi* I sequences in the CL-Brener strain further supports the proposal of multiple progenitors in the evolution of this *T. cruzi* hybrid strain (El Sayed et al. 2005).

We have also identified the processing sites of *rpS4* primary transcripts by comparing the genomic sequences with published cDNA data. Analyses of the untranslated regions demonstrate that each transcript is different, but can be grouped into two types according to the 3' UTR (copy 1 and copies 2/3). It has been demonstrated that differences in the 3' UTR of  $\beta$ -tubulin mRNAs result in differences in mRNA stability of the specific transcripts in trypomastigotes and amastigotes (Bartholomeu et al. 2002). A working hypothesis would propose that the distinct 3' UTR in the *rpS4* transcripts may participate differentially in the physiology of expression of this protein.

Finally, it is described here that *rpS4* is recognized by two thirds of individuals with positive serologic response to *T. cruzi* antigens and more than 90% of patients with proven chagasic disease. There were no false positives as none of the control sera recognized the antigen. The prevalence of reactivity to various *T. cruzi* proteins in patients with chronic symptomatic chagasic disease by Western blot (Sánchez et al. 2001) has been reported. In this study it was found that the prevalence of reactivity to specific protein bands varied from 23 to 100%. However, only two proteins of 32 and 42 kDa were recognized by 90% of the patients or more.

*T. cruzi* ribosomes are known to be immunogenic. However the majority of studies have been directed at proteins that elicit the production of autoantibodies. Antibodies against *T. cruzi* ribosomal P proteins have been shown to cross react with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope (Mesri et al. 1990, Levitus et al. 1991, Aznar et al. 1995). Fine epitope mapping demonstrated that these pathogenic antibodies are directed to the acidic portions of their carboxyl-terminal regions. These antibodies also react with the acidic epitope of the second extracellular loop of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor stimulating it (Elies et al. 1996, Kaplan et al. 1997, Lopez Bergami et al. 2001), an effect that contributes to the pathogenesis of chagasic cardiomyopathy. It has also been shown that the *T. cruzi* riboso-

mal protein L27 has an epitope that cross-reacts with the Sm-epitope present in small nuclear ribonucleoproteins (Perone et al. 2003). Approximately two thirds of patients with Chagas disease have antibodies against the Sm epitope present in both human and trypanosomal small nuclear ribonucleoproteins (Bach-Elias et al. 1998). The role of these antibodies in the pathogenesis of the disease remains to be determined.

Analysis of expressed sequence tags from *T. cruzi* amastigotes, the reproductive stage in humans, has shown that 9% clones of the cDNA library encoded for ribosomal proteins with more than 30 classes of ribosomal proteins being identified (Cerqueira et al. 2005). Interestingly, an immunosurvey of the same library with sera from patients with chagasic disease revealed that ribosomal proteins also represent the largest class of antigen coding genes expressed in amastigotes (DaRocha et al. 2002). However only a subset of the ribosomal proteins expressed appeared antigenic. Besides the previously reported ribosomal P proteins, the ribosomal proteins L19 and L7a were also found to be antigenic.

In *Leishmania* the *rpS4* antigen (with a 91% identity with *T. cruzi* *rpS4*) was identified using parasite-specific T cell lines derived from an immune donor and has been proposed as a vaccine candidate (Probst et al. 2001). Further studies should establish the value of *rpS4* antigen as a diagnostic tool or as a vaccine candidate.

#### ACKNOWLEDGMENTS

To Dr Imelda López Villaseñor for the critical reading of the manuscript and Juliana Herrera for technical assistance.

#### REFERENCES

- Aznar C, Lopez-Bergami P, Brandariz S, Mariette C, Liegeard P, Alves MD, Barreiro EL, Carrasco R, Lafon S, Kaplan D, Levitus G, Levin MJ 1995. Prevalence of anti-R-13 antibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 12: 231-238.
- Bach-Elias M, Bahia D, Teixeira DC, Cicarelli RM 1998. Presence of autoantibodies against small nuclear ribonucleoprotein epitopes in Chagas' patients' sera. *Parasitol Res* 23: 796-799.
- Bartholomeu DC, Silva RA, Galvao LM, el-Sayed NM, Donelson JE, Teixeira SM 2002. *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. *Exp Parasitol* 102: 123-133.
- Bogliolo AR, Lauria-Pires L, Gibson WC 1996. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Trop* 61: 31-40.
- Carrasco HJ, Frame IA, Valente SA, Miles MA 1996. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 54: 418-424.
- Cerqueira GC, DaRocha WD, Campos PC, Zouain CS, Teixeira SM 2005. Analysis of expressed sequence tags from *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 385-389.
- Cevallos AM, López-Villaseñor I, Espinosa N, Herrera J, Hernández R 2003. *Trypanosoma cruzi*: Allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts. *Exp Parasitol* 103: 27-34.
- DaRocha WD, Bartholomeu DC, Macedo CD, Horta MF, Cunha-Neto E, Donelson JE, Teixeira SM 2002. Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Parasitol Res* 88: 292-300.
- Elies R, Ferrari I, Wallukat G, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M, Hoebeke J, Levin MJ 1996. Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J Immunol* 157: 4203-4211.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-415.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GA, Acosta N, de Arias AR, Miles MA 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 421: 936-939.
- Guzman-Bracho C 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends Parasitol* 17: 372-376.
- Hernandez R, Palacios S, Herrera J, Martinez-Calvillo S, Lopez I 1998. The deduced primary structure of a ribosomal protein S4 from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta* 1395: 321-325.
- Hummel HS, Gillespie RD, Swindle J 2000. Mutational analysis of 3' splice site selection during trans-splicing. *J Biol Chem* 275: 35522-35531.
- Kaplan D, Ferrari I, Bergami PL, Mahler E, Levitus G, Chiale P, Hoebeke J, Van Regenmortel MH, Levin MJ 1997. Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10301-10306.
- Laemmli UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Levitus G, Hontebeyrie-Joskowicz M, Van Regenmortel MH, Levin MJ 1991. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clin Exp Immunol* 85: 413-417.
- Lopez Bergami P, Scaglione J, Levin MJ 2001. Antibodies against the carboxyl-terminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic. *FASEB J* 15: 2602-2612.
- Lopez-Estrano C, Tschudi C, Ullu E 1998. Exonic sequences in the 5' untranslated region of alpha-tubulin mRNA modulate trans splicing in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 18: 4620-4628.

- Machado CA, Ayala FJ 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7396-7401.
- McDaniel J P, Dvorak J A 1993. Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol Biochem Parasitol* 57: 213-222.
- Mesri EA, Levitus G, Hontebeyrie-Joskowicz M, Dighiero G, Van Regenmortel MH, Levin MJ 1990. Major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinant in Chagas' heart disease shares homology with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope. *J Clin Microbiol* 28: 1219-1224.
- Perone D, Santos MA, Peixoto MS, Cicarelli RM 2003. *Trypanosoma cruzi*: identification and characterization of a novel ribosomal protein L27 (TcrL27) that cross-reacts with an affinity-purified anti-Sm antibody. *Parasitology* 126: 577-583.
- Probst P, Stromberg E, Ghalib HW, Mozel M, Badaro R, Reed SG, Webb JR 2001. Identification and characterization of T cell-stimulating antigens from *Leishmania* by CD4 T cell expression cloning. *J Immunol* 166: 498-505.
- Rangel-Flores H, Sánchez B, Mendoza-Duarte J, Barnabé C, Brenière SF, Ramos C, Espinoza B 2001. Serological and parasitological demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban central area of Mexico: Correlation with electrocardiographic alterations. *Am J Trop Med Hyg* 65: 887-895.
- Sánchez B, Monteón V, Reyes P, Espinoza B 2001. Standardization of ELISA and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi*. Antibodies using extracts of Mexican strains as antigens. Concordance between laboratories. *Arch Med Res* 32: 382-388.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83:141-152.
- Synetos D, Dabeva MD, Warner JR 1992. The yeast ribosomal protein S7 and its genes. *J Biol Chem* 267: 3008-3013.
- Teixeira AR, Santos-Buch CA 1974. The immunology of experimental Chagas' disease. I. Preparation of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral antibody response to their antigens. *J Immunol* 113: 859-869.
- Teixeira AR, Santos-Buch CA 1975. The immunology of experimental Chagas' disease. II. Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigens. *Immunology* 28: 401-410.
- Teixeira AR, Teixeira ML, Santos-Buch CA 1975. The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *Am J Pathol* 80: 163-180.
- Teixeira ARL 1987. The Stercorarian trypanosomes. In EJJ Soulsby, *Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis*, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 25-118.
- Telleria J, Barnabe C, Hide M, Banuls AL, Tibayrenc M 2004. Predominant clonal evolution leads to a close parity between gene expression profiles and subspecific phylogeny in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 137: 133-141.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Uchiumi T, Kikuchi M, Ogata K 1986. Cross-linking study on protein neighborhoods at the subunit interface of rat liver ribosomes with 2-iminothiolane. *J Biol Chem* 261: 9663-9667.
- Vazquez MP, Schijman AG, Levin MJ 1994. A short interspersed repetitive element provides a new 3' acceptor site for trans-splicing in certain ribosomal P2 beta protein genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 64: 327-336.
- Westenberger SJ, Barnabe C, Campbell DA, Sturm NR 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171: 527-543.
- Westermann P, Nygard O 1983. The spatial arrangement of the complex between eukaryotic initiation factor eIF-3 and 40 S ribosomal subunit. Cross-linking between factor and ribosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 741: 103-108.

